



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**A fauna malacológica da albufeira do  
Alqueva: uma nova visão face às alterações  
climáticas**

BRUNO FILIPE MEDINAS CONCHINHA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ESPECIALIDADE EM  
PARASITOLOGIA MÉDICA**

JANEIRO

2016



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**A fauna malacológica da albufeira do Alqueva:  
uma nova visão face às alterações climáticas**

**Autor:** Bruno Filipe Medinas Conchinha

**Orientador:** Professora Doutora Maria Manuela Calado

**Coorientador:** Doutor Miguel Ângelo da Silva Pereira

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas especialidade em  
Parasitologia Médica

Tese realizada durante o projeto **PEst-OE/SAL/UI0074/2011** da **FCT** – Fundação para a Ciência e Tecnologia, do **GHTM** – Global Health & Tropical Medicine e da **UEI PM/HMM** – Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica/Helminologia e Malacologia Médicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (**IHMT/UNL**).



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902

**Publicações no âmbito deste trabalho:**

Conchinha, B.F., Pereira, M. & Calado, M.M. 2015. Distribuição de moluscos do género *Physa* (Pulmonata, Physidae) na Albufeira do Alqueva. Apresentação no Congresso Português de Malacologia, 2015. Lisboa.

## AGRADECIMENTOS

*À Professora Doutora Maria Manuela Calado por todos os ensinamentos, orientação, paciência, esforço e dedicação para comigo e para com a realização deste trabalho. Pelo suporte e por muitas vezes fazer com que ganhasse novamente o foco e a motivação para a conclusão deste trabalho. Pelas palavras amigas e também pelos raspanetes. Pelo rigor na correção deste trabalho e por toda a preocupação no meu sucesso e no sucesso deste projeto.*

*Ao Doutor Miguel Pereira pela ajuda prestada e pelos conhecimentos transmitidos principalmente na área da geofísica. Pelo seu contributo para a realização deste trabalho, bem como todas as explicações e cuidado que foi tendo durante a realização deste projeto.*

*À Professora Doutora Silvana Belo, à Professora Doutora Isabel Maurício e ao Doutor Pedro Ferreira pela ajuda prestada durante o período do trabalho laboratorial.*

*À professora Luzia Gonçalves pela valiosa ajuda na análise estatística e na compreensão dos dados.*

*A toda a Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica/Helminologia e Malacologia Médicas, por todo o apoio e acolhimento.*

*Aos docentes do Mestrado em Ciências Biomédicas – Especialidade em Parasitologia Médica por no decorrer deste período ter sido possível absorver os mais vastos conhecimentos nesta área.*

*Aos meus pais por permitirem sempre que siga os meus sonhos. Por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida e pelos muitos sacrifícios que vão fazendo na sua vida para me poderem ajudar sempre. Pelas palavras de encorajamento e por não me deixarem desistir.*

*À minha irmã por ir cuidando de mim e do meu crescimento, por ser muitas vezes a confidente e o ombro amigo.*

*À Daniela, ao João e ao Diogo, a minha segunda família, por fazerem parte do meu dia-a-dia e por o preencherem da melhor forma. Por me ouvirem e por toda a ajuda na realização deste trabalho, ouvindo muitas vezes e discutindo comigo a melhor forma de o executar.*

*Aos meus colegas de trabalho, João, Sara, Rita, Catarina, Bernardo, Ana e Leonor. Por me ajudarem a gerir o meu tempo da melhor forma e por muitas vezes serem o porto de abrigo no meio do cansaço do trabalho e do estudo.*

*Às minhas companheiras de mestrado, Adriana, Catarina, Bianca, Marta P. e Marta R., por viverem comigo esta aventura desde o início do mestrado em Ciências Biomédicas, e por partilharem comigo o trabalho de cada dia.*

*Ao meu amigo Manuel José por ser aquilo a que se chama um mestre e ainda que longe vai orientando o meu caminho.*

*Ao Alexandre e à Andreia pela amizade de uma vida e pelo companheirismo durante o tempo de realização deste trabalho.*

*À Teresa pelo suporte e apoio e por toda a dedicação.*

*A todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.*

*E por fim, a Deus pela presença constante na minha vida e por ser a força que me conduz.*

## RESUMO

Os moluscos de água doce têm um importante papel na dispersão das parasitoses por tremátodes, funcionando como hospedeiros intermediários dos parasitas. Dentro da classe Gastropoda, as famílias Physidae, Planorbidae e Lymnaeidae têm importância em saúde humana e animal, pois algumas das espécies são hospedeiros intermediários de tremátodes digenéticos. A sua distribuição por toda a Europa tem sido bastante estudada.

A albufeira do Alqueva é, atualmente, o maior lago artificial da Europa e, ao longo da sua vasta extensão, pode apresentar locais adequados a servir de habitat a moluscos que sejam hospedeiros intermediários de tremátodes digenéticos incluindo espécies causais de dermatites cercarianas em humanos. Esta albufeira faz parte da rota migratória de algumas espécies de aves, e é utilizada pela população para atividades de lazer e recreativas. Assim, torna-se pertinente investigar a existência de condições favoráveis à transmissão destas parasitoses, tal como se verifica em ecossistemas hidrológicos semelhantes noutras regiões da Europa.

Neste trabalho foram analisados 18 locais ao longo da albufeira do Alqueva e colhidos 582 moluscos, dos quais 570 foram identificados como *Physa acuta* (syn. *Physella acuta*).

Detetou-se eliminação de cercárias do tipo *Furcocercus cercaria* ( $\approx$  família Strigeidae), descritas como potenciais responsáveis pela ocorrência de dermatites cercarianas, apenas nos moluscos *P. acuta* colhidos no ancoradouro de Monsaraz, local bastante utilizado pela população.

A caracterização bioecológica dos habitats sugeriu que a temperatura é o fator com maior influência na dispersão dos moluscos, bem como na infeção dos mesmos por tremátodes.

Recorrendo aos Sistemas de Informação Geográfica (SIG) foi criado um mapa preditivo da presença de moluscos com base em variáveis (temperatura, pH, condutividade e oxigénio dissolvido na água) medidas nos diferentes locais e baseado no modelo de máxima entropia – MaxEnt. O modelo estimou haver uma maior probabilidade da existência de moluscos nas zonas periféricas da albufeira.

A presença de aves residentes e migratórias no ancoradouro de Monsaraz, o único local onde se detetaram moluscos infetados com *F. cercaria*, poderá conduzir a uma dispersão do parasita para diferentes locais com presença de moluscos, e, portanto, potenciais focos de infeção.

Os resultados obtidos reforçam a necessidade de um estudo mais aprofundado deste ecossistema de modo a identificar o risco de ocorrência destas parasitoses zoonóticas emergentes.

**Palavras-chave:** albufeira do Alqueva; *Physa acuta*; dermatites cercarianas; Sistemas de Informação Geográfica (SIG).

## ABSTRACT

Freshwater snails have an important role in spreading the parasitic diseases caused by trematode parasites, working as intermediate hosts for parasites. Within the Gastropoda class, the Physidae, Planorbidae and Lymnaeidae families are identified given their importance in terms of human and animal health, once some species act as intermediate hosts of digenetic trematodes. Their distribution around Europe is well known.

The Alqueva lake is, at the moment, the biggest artificial lake in Europe and, in its vast extension, can present locations that can be adequate habitats for freshwater snails that can act as intermediate hosts of digenetic trematode parasites, including some species responsible for cercarial dermatitis in humans. It is part of the migratory route of some species of birds, and the lake is used by the population for many leisure and recreational activities. As such, it becomes pertinent to investigate the existence of favourable conditions for the transmission of these parasitic diseases, as seen in similar hydrological ecosystems in other regions of Europe.

In this work 18 locations around the Alqueva lake were analysed and 582 snails collected, of which 570 were identified as *Physa acuta* (syn. *Physella acuta*).

Cercariae of type *Furcocercus cercaria* ( $\approx$  family Strigeidae), described as potential responsible for the occurrence of cercarial dermatitis (swimmer's itch), were observed from *P. acuta* snails, collected at the anchorage of Monsaraz village, a place widely used by the population.

The bio-ecological characterization of the habitats suggested that temperature is the main factor influencing freshwater snail dispersion, as well as trematode infection of snails.

Using Geographical Information Systems (GIS), a map was created to predict the presence of fresh water snails according to environmental variables (water temperature, pH, conductivity and water oxygen levels), based on the maximum entropy model – MaxEnt. The model predicted a higher probability for snail presence in peripheral areas of the lake.

The presence of resident and migratory birds in the anchorage of Monsaraz village, the habitat where snails infected with *F. cercaria* were detected, can lead to parasite spreading to new locations, where snails are present, and thus new foci of infection.

Our results reinforce the need for further study of this ecosystem in order to identify the risk of these emerging zoonotic parasitic diseases.

**Keywords:** Alqueva lake; *Physa acuta*; swimmer's itch; Geographic Information Systems (GIS).

# ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. A Albufeira do Alqueva .....	1
1.1.1. Caracterização geográfica, climatérica e biológica .....	2
1.2. Moluscos de água doce, hospedeiros intermediários de parasitas .....	5
1.2.1. Género <i>Physa</i> , Draparnaud 1801 .....	8
1.2.2. Género <i>Planorbis</i> , Froriep 1806 .....	8
1.2.3. Género <i>Lymnaea</i> , Lamarck 1799 .....	9
1.2.4. Distribuição geográfica .....	10
1.2.5. Vigilância e controlo de moluscos .....	10
1.3. Aplicação da biologia molecular ao estudo de moluscos .....	12
1.3.1. Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	12
1.3.2. Marcadores moleculares .....	13
1.4. Dermatites Cercarianas .....	14
1.4.1. Etiologia .....	14
1.4.2. Distribuição geográfica .....	16
1.4.3. Ciclo biológico e de transmissão .....	18
1.4.4. Patologia, Sintomatologia e Tratamento .....	21
1.5. O impacto das alterações climáticas .....	23
1.6. O papel dos Sistemas de Informação Geográfica (SIG) no estudo das parasitoses .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
3.1. Colheita e identificação dos moluscos .....	26



3.2. Pesquisa de cercárias .....	28
3.3. Dissecção dos moluscos .....	29
3.4. Características morfométricas das conchas .....	30
3.5. Análise de dados .....	31
3.6. Caracterização molecular .....	32
3.6.1. Extração de DNA Genómico .....	32
3.6.2. Quantificação do DNA Genómico.....	32
3.6.3. Amplificação do DNA Genómico .....	33
3.6.4. Sequenciação do DNA Genómico .....	34
3.7. Construção do modelo SIG.....	35
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
4.1. Colheita dos moluscos .....	36
4.2. Identificação dos moluscos.....	41
4.3. Pesquisa de cercárias .....	44
4.4. Características morfométricas das conchas e a variabilidade das populações .....	45
4.5. Análise das variáveis .....	53
4.5.1. Variáveis ambientais – Temperatura, pH, Condutividade elétrica e Oxigénio dissolvido .....	53
4.5.2. Características biológicas dos habitats – Vegetação, Substrato e Exposição Solar .....	58
4.6. DNA Genómico dos moluscos .....	62
4.6.1. Polimorfismos dos genes CO1 e 16S.....	62
4.6.2. Sequênciação das amostras amplificadas .....	63
4.6.3. Modelo SIG de distribuição territorial.....	68
<b>5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <b>A</b> – Barragem do Alqueva (EDIA); <b>B</b> – Descargas da barragem do Alqueva (EDIA); <b>C</b> – Alqueva, vista da Amieira Marina (AMIEIRA MARINA); <b>D</b> – Alqueva, vista do grande lago ( <a href="http://www.portalalentejano.com/">http://www.portalalentejano.com/</a> ) .....	2
<b>Figura 2</b> – Mapa da região do Alqueva (Pereira, 2015) .....	4
<b>Figura 3</b> – <i>Physa acuta</i> ; <b>A</b> – (Conchinha, 2015, IHMT – UEI PM/HMM); <b>B</b> – (adaptado de Paraense & Pointier 2003); <b>C</b> – (Dillon 2006, <a href="http://www.fwgna.org">http://www.fwgna.org</a> ).....	8
<b>Figura 4</b> – <i>Planorbarius metidjensis</i> ; <b>A</b> ; <b>B</b> – (Conchinha, 2015, IHMT – UEI PM/HMM) .....	9
<b>Figura 5</b> – <i>Lymnaea columella</i> ; <b>A</b> ; <b>B</b> – (Conchinha, 2015, IHMT – UEI PM/HMM) .....	9
<b>Figura 6</b> <b>A</b> – Cercária de <i>T. franki</i> (Selbach <i>et al.</i> , 2015); <b>B</b> – Cercária de <i>T. szidati</i> ( <a href="http://www.helminths.at/">http://www.helminths.at/</a> ); <b>C</b> – Cercária de <i>T. ocellata</i> ( <a href="http://www.weichtiere.at/">http://www.weichtiere.at/</a> )....	15
<b>Figura 7</b> – Ocorrência de schistosomose aviária e casos de dermatite cercariana reportados na Europa (Soldánová <i>et al.</i> , 2013).....	17
<b>Figura 8</b> – Ciclo de vida da schistosomose aviária e da dermatite cercariana (Adaptado de CDC) .....	19

<b>Figura 9 A</b> – Desenvolvimento de larva de <i>Trichobilharzia szidati</i> no hospedeiro intermediário, <i>Lymnaea stagnalis</i> . HEP – Tecido do Hepatopâncreas, INS – Tecido do intestino; <b>B</b> – Pata de pato mostrando a penetração das cercárias; <b>C</b> – Cavidade nasal de pato mostrando petéquias na mucosa provocadas pelo parasita (Horák & Kolářová, 2011). .....	20
<b>Figura 10</b> – Casos de Dermatite cercariana; <b>A</b> - (Soldánová <i>et al.</i> , 2013); <b>B</b> – (Fraser <i>et al.</i> , 2009); <b>C</b> – (CDC) .....	21
<b>Figura 11</b> – Diagrama do estudo efetuado .....	27
<b>Figura 12</b> – Exposição dos moluscos à luz para verificar a libertação de cercárias; <b>A; B</b> – (Conchinha, 2015, IHMT – UEI PM/HMM) .....	28
<b>Figura 13</b> – Esquema das medições de um exemplar do género <i>Physa</i> .....	30
<b>Figura 14</b> – Mapa da albufeira do Alqueva com identificação dos habitats em estudo .....	38
<b>Figura 15 A</b> – ancoradouro de Monsaraz; <b>B</b> – albufeira de Mourão; <b>C</b> – colheita de moluscos no parque de merendas da Estrela; <b>D</b> – Granja; <b>E</b> – ancoradouro da Amieira; <b>F</b> – parque de merendas do Campinho; .....	39
<b>Figura 15 (cont.) G</b> – molusco da espécie <i>Physa acuta</i> em Juromenha; <b>H</b> – ancoradouro de Cheles; <b>I</b> – Amieira (debaixo da ponte); <b>J</b> – Mourão (debaixo da ponte); <b>L</b> – moluscos da espécie <i>Physa acuta</i> no ancoradouro de Monsaraz; <b>M</b> – albufeira do Alqueva, vista da vila de Monsaraz .....	40
<b>Figura 16</b> – Totais de moluscos por género capturados nos diferentes locais .....	43

<b>Figura 17</b> – Cercárias obtidas depois da exposição à luz dos moluscos capturados no ancoradouro de Monsaraz (A); <b>A</b> ; <b>B</b> – (Conchinha, 2015 - IHMT – UEI PM/HMM) .....	44
<b>Figura 18</b> – Relação entre as medidas das conchas com o número de moluscos capturados .....	49
<b>Figura 19</b> – Dendrograma das ligações médias entre os grupos estudados .....	51
<b>Figura 20</b> – Boxplots das diferentes variáveis com referência à presença (1) e ausência (0) de moluscos (Pereira, 2015); <b>A</b> – Temperatura; <b>B</b> – pH; <b>C</b> – O <sub>2</sub> ; <b>D</b> – Condutividade elétrica.....	56
<b>Figura 21</b> – Retas de regressão linear com base nas variáveis estudadas e no número de moluscos capturados em cada local (ABU) (Pereira, 2015); <b>A</b> – Temperatura; <b>B</b> – pH; <b>C</b> – O <sub>2</sub> ; <b>D</b> – Condutividade elétrica .....	57
<b>Figura 22</b> – Relação entre o número de habitats e as características da vegetação encontrada com o número de moluscos capturados.....	61
<b>Figura 23</b> – Relação entre o número de habitats e as características do substrato encontrado com o número de moluscos capturados .....	61
<b>Figura 24</b> – Amplificação de produto de PCR em gel de agarose a 1% para o gene 16S.....	62
<b>Figura 25</b> – Amplificação de produto de PCR em gel de agarose a 1% para o gene CO1 .....	62
<b>Figura 26</b> – Alinhamento dos nucleótidos para o gene 16S de <i>Physa acuta</i> ( <i>Physella acuta</i> ) .....	64

<b>Figura 27</b> – Alinhamento dos nucleótidos para o gene CO1 de <i>Physa acuta</i> ( <i>Physella acuta</i> ) .....	65
<b>Figura 28</b> – Comparação das sequências obtidas com uma sequência contida no banco de dados (GenBank: AY651193.1) para o gene 16S .....	66
<b>Figura 29</b> – Comparação das sequências obtidas com uma sequência contida no banco de dados (GenBank: KF412768.1) para o gene CO1 .....	67
<b>Figura 30</b> – Interpolação da temperatura com recurso ao inverso da distância (Conchinha, 2015) .....	69
<b>Figura 31</b> – Interpolação do pH com recurso ao inverso da distância (Conchinha, 2015) .....	70
<b>Figura 32</b> – Interpolação da condutividade elétrica com recurso ao inverso da distância (Conchinha, 2015) .....	71
<b>Figura 33</b> – Interpolação do oxigénio dissolvido com recurso ao inverso da distância (Conchinha, 2015) .....	72
<b>Figura 34</b> – Curvas de influência das variáveis no modelo MaxEnt (Pereira, 2015); A – Resposta à temperatura; B – Resposta ao pH; C – Resposta à condutividade elétrica; D – Resposta ao oxigénio dissolvido .....	73
<b>Figura 35</b> – Mapa da albufeira do Alqueva com a aplicação do modelo MaxEnt, com recurso às variáveis temperatura, pH, condutividade térmica e oxigenação da água (Pereira, 2015) .....	75

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Posição sistemática dos moluscos do género <i>Physa</i> , <i>Planorbarius</i> e <i>Lymnaea</i> (Adaptado de Brown, 1994).....	7
<b>Tabela 2</b> – Sequências de primers aplicados para o estudo das regiões 16S e CO1 .....	33
<b>Tabela 3</b> – Condições do PCR na amplificação das regiões 16S e CO1 .....	34
<b>Tabela 4</b> – Identificação dos habitats .....	37
<b>Tabela 5</b> – Totais de moluscos capturados por género e habitat.....	42
<b>Tabela 6</b> – Medidas de dispersão do número de moluscos .....	43
<b>Tabela 7</b> – Características morfométricas da concha de <i>Physa acuta</i> nos habitats em estudo .....	46
<b>Tabela 8</b> – Matriz de proximidade utilizando a distância euclidiana para os habitats em estudo .....	50
<b>Tabela 9</b> – Valores obtidos para as variáveis temperatura, pH, condutividade elétrica e O <sub>2</sub> nos habitats em estudo .....	54
<b>Tabela 10</b> – Medidas de dispersão da temperatura, pH, condutividade elétrica e O <sub>2</sub> ....	54
<b>Tabela 11</b> – Aplicação do coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) .....	58
<b>Tabela 12</b> – Tipo de vegetação e substratos encontrados nos habitats em estudo .....	60
<b>Tabela 13</b> – Contribuição das variáveis para a execução do modelo MaxEnt.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\pi$**  – Diversidade nucleotídica
- $\rho$**  – Coeficiente de correlação de Spearman
- Aa** – Altura da abertura da concha
- At** – Altura total da concha
- Aa/La** – relação entre a altura da abertura e a largura da abertura
- At/Lt** – relação entre a altura total e a largura total
- CaCO<sub>3</sub>** – Carbonato de Cálcio
- Ce** – Condutividade elétrica
- CTAB** – Tampão Brometo de Hexadeciltetrametilamônio (Cetyltrimethylammonium Bromide), Amnesco® - C<sub>9</sub>H<sub>42</sub>NBr
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
- EDIA** – Empresa de Desenvolvimento e Infraestruturas do Alqueva
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (Ethylenediamine Tetraacetic Acid)
- H<sub>2</sub>O** – Água
- Hd** – Diversidade haplotípica
- ICAT** – Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia
- K** – Número médio da diferença nucleotídica
- La** – Largura da abertura da concha
- Lt** – Largura total da concha
- mtDNA** – DNA mitocondrial
- NaCl** – Cloreto de Sódio
- NCBI** - National Center for Biotechnology Information
- O<sub>2</sub>** – Oxigénio dissolvido
- P** – Significância estatística
- PCR** – Polymerase Chain Reaction
- RNA** – Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
- T** – Temperatura
- TAE** – Tampão Tris-Acetato EDTA
- TE** – Tampão Tris EDTA

**SIG** – Sistema de Informação Geográfica

**UEI PM/HMM** – Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia  
Médica/Helmintologia e Malacologia Médicas

**UV** – Ultravioleta



## **1. INTRODUÇÃO**

Os ecossistemas de água doce estão entre os mais degradados e alterados do planeta, em grande parte devido à ação humana, como: construção de barragens, canais de irrigação, a introdução acidental de espécies, entre outros. Estas questões levaram a uma modificação extensiva dos mesmos, promovendo o aparecimento de doenças emergentes. As doenças emergentes podem interagir com as elevadas perdas de biodiversidade, podendo levar à extirpação das populações ameaçadas, à extinção de espécies ou até mesmo à introdução de novas, quer de parasitas quer de hospedeiros intermediários ou vetores (Okamura & Feist, 2011).

### **1.1. A Albufeira do Alqueva**

A albufeira do Alqueva representa atualmente a maior reserva de água da Europa (EDIA), com uma dimensão de 83 km e uma área de 250 km<sup>2</sup>, abrangendo os concelhos portugueses de Moura, Portel, Mourão, Reguengos de Monsaraz e Alandroal, e ainda os concelhos espanhóis de Olivença, Cheles, Alconchel e Villanueva del Fresno. Apresenta uma capacidade total de armazenamento de 4150 milhões de m<sup>3</sup>, dos quais são utilizados 3150 milhões de m<sup>3</sup> em exploração normal.

A barragem é um projeto da EDIA – Empresa de Desenvolvimento e Infraestruturas do Alqueva, com vista a rentabilizar e promover o desenvolvimento sustentado da região conseguido pela agricultura.

A região do Alentejo, onde se encontra a albufeira, representa cerca de 1/3 da área geográfica do país, tem uma baixa densidade populacional e apresentava, até bem pouco

tempo, uma carência de água proveniente do clima e da fraca pluviosidade nos meses de verão. Por estas razões a albufeira representa, atualmente, uma fonte de riqueza para a região, pois alia o potencial energético, de abastecimento para consumo humano e atividades agrícolas e pecuárias às possibilidades turísticas e de empreendedorismo.

Na **Figura 1 (A a D)** podem ser observados vários locais da albufeira do Alqueva.



**Figura 1** **A** – Barragem do Alqueva (EDIA); **B** – Descargas da barragem do Alqueva (EDIA); **C** – Alqueva, vista da Amieira Marina (AMIEIRA MARINA); **D** – Alqueva, vista do grande lago (<http://www.portaalentejano.com/>)

### 1.1.1. Caracterização geográfica, climatérica e biológica

A albufeira, que se localiza no vale do Guadiana, com latitude aproximada entre 37° e 38° 50' N, apresenta um sistema de albufeiras e regadios que contribuem para a dimensão da sua área, a **Figura 2** apresenta o mapa da região com o destaque da albufeira (EDIA).

A qualidade da água, segundo o Grupo de Projeto Alqueva Agrícola no relatório publicado em 2005, apresenta uma deterioração nos meses mais quentes devido à

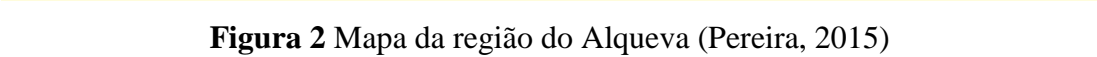
estratificação da água e com uma maior gravidade nos períodos de grande pluviosidade em que existe um arrastamento das cargas poluentes oriundas das margens adjacentes.

Segundo o relatório técnico do ICAT de 1995 o clima é temperado, com invernos chuvosos e verões secos e quentes. A região apresenta uma temperatura ambiental anual de cerca de 16°C e valores de humidade a variar entre os 77% e os 58% ao longo do dia. A precipitação anual varia entre valores de 400mm na região sul e cerca de 700mm na região norte. Dados mais recentes da EDIA, contabilizados a 24 de maio de 2015 apresentam uma temperatura mínima de 15.6°C e máxima de 27.7°C, e uma humidade mínima de 26% e máxima de 75%. No que respeita à informação da temperatura da água o último boletim lançado neste primeiro semestre de 2015 apresenta valores de 12°C, sendo que os mesmos se reportam aos meses de inverno, paralelamente o mesmo boletim referente ao segundo semestre do ano de 2014 e por isso aos meses de verão, apresenta valores de 21.6°C.

No último inventário apresentado em 2012 pela EDIA, onde foram estudadas as ilhas existentes no Alqueva, a vegetação apresentada caracterizava-se por associados de matos e povoamentos de azinheira e oliveira, sendo que 80% das espécies encontradas seria de características terrestres e os restantes 20% de características higrófitas. O mesmo inventário caracterizou a fauna com base nos grupos biológicos: lepidópteros, carabídeos, aracnídeos, anfíbios, répteis, aves e micromamíferos, além da caracterização da fauna aquática, em especial os peixes.

No que respeita às características do solo, o relevo é em geral pouco acentuado, sendo predominante a planície alentejana, no entanto a zona sul da margem esquerda do Guadiana e a área circundante ao rio Degebe apresentam relevos mais irregulares. São ainda verificadas o conjunto de serras de Portel e do Mendro (EDIA).

A albufeira do Alqueva, sendo o maior reservatório de água doce da Europa é bem representativo dos diferentes tipos de habitats, apresentando condições ótimas para o desenvolvimento de moluscos dulçaquícolas e contribuir assim para a sua biodiversidade. Ao mesmo tempo a albufeira apresenta aves migratórias e residentes, como o pato-real (*Anas platyrhynchos*), o pato trombeiro (*Anas clypeata*), a garça-branca-pequena (*Egretta garzetta*), o grou comum (*Grus grus*) entre outras e é um lugar de eleição para a sua nidificação (<http://omelhoralentejodomundo.blogspot.pt>).



## 1.2. Moluscos de água doce, hospedeiros intermediários de parasitas

O meio aquático é frequentemente usado na transmissão de tremátodes parasitas (Phylum: Platyhelminthes; Class: Trematoda) entre hospedeiros definitivos e intermediários (Malek & Cheng, 1974). Esta transmissão é feita através da mobilidade no meio aquático das formas larvares (miracídeos e cercárias) que penetram o hospedeiro intermediário (molusco de água doce) ou o hospedeiro definitivo (vertebrado), respetivamente (Malek, 1980). Os moluscos de água doce desempenham um importante papel no ciclo de vida dos trematódes, como primeiros e muitas vezes como segundos hospedeiros intermediários, influenciando diretamente a distribuição dos parasitas (Albrecht *et al.*, 2007).

A classe Gastropoda tem uma enorme importância em medicina humana e animal e nesta classe estão englobados, moluscos pertencentes às famílias Lymnaeidae, Physidae e Planorbidae (Alyakrinskaya, 2002). Estes apresentam uma ampla distribuição geográfica por toda a Europa e algumas espécies destas famílias têm uma importância relevante, quer a nível de saúde humana, quer a nível da saúde animal, pelo seu importante papel como hospedeiros intermediários de tremátodes digenéticos. Devido à sua grande capacidade de adaptação ao meio ambiente, estes podem sobreviver em águas de baixo teor em oxigénio devido à presença de hemoglobina na sua hemolinfa (Alyakrinskaya, 2002).

Os gastrópodes apresentam como principais características: torção em 180° da massa visceral durante o desenvolvimento embrionário; presença de rádula (dentes quitinosos móveis, dispostos em séries que variam em número e forma) e manto ou pálio (tecido responsável pela formação da concha que cobre a massa visceral); ocorrência da circulação, respiração, excreção e reprodução na cavidade palial ou cavidade do manto; sistema circulatório aberto; respiração branquial, pulmonar ou tegumentar; tubo digestivo completo; sistema nervoso ganglionar; 1 ou 2 pares de tentáculos; presença de massa cefalopodal (pé); concha normalmente univalva e espiralada; hermafroditas ou dióicos; desenvolvimento direto ou indireto; desenvolvem-se em habitats aquáticos, tanto em água doce como em água salgada, e terrestres (Rey, 1956; Malek, 1980; Ministério Saúde Brasil, 2008).

Dependendo das espécies poderão existir particularidades nos habitats ótimos para o seu desenvolvimento. No entanto é comum encontrarem-se em rios, ribeiros, lagos, canais de irrigação, poças de água ou qualquer outro curso de água (Malek, 1980; Brown, 1994). Dependendo da espécie também estão associadas aos habitats, características como a velocidade e qualidade da água, fauna e flora associada e ainda o tipo de substrato (Azevedo *et al.* 1691; Malek, 1980).

No que respeita aos restantes fatores abióticos como a área, o volume e a profundidade do criadouro o mesmo terá relevância para a disponibilidade de nutrientes, bem como para a exposição solar que irá também influenciar os restantes fatores.

A temperatura que varia com a altitude e a latitude tem efeito na fotossíntese e na decomposição da matéria e está relacionada com a taxa de reprodução dos moluscos, os quais podem sobreviver em temperaturas entre os 0°C e os 42°C. Os restantes fatores como a disponibilidade de NaCl, de CaCO<sub>3</sub> e fatores biológicos como a presença de parasitas, predadores, bactérias, fungos, vegetação e a microflora disponível também apresentam influência na presença ou ausência de moluscos nos determinados habitats (Malek, 1980).

A classe Gastropoda apresenta a subclasses Prosobranchia, Opisthobranchia e Pulmonata. Os moluscos com principal importância médica e veterinária pertencem à classe Pulmonata, mais especificamente à ordem Basommatophora, onde se inserem as famílias Chilinae, Lymnaeidae, Physidae, Ancyliidae e Planorbidae (Malek & Cheng, 1974; Malek, 1980; Brown, 1994; Ministério Saúde Brasil 2008).

No presente trabalho será feita apenas referência aos géneros *Physa*, *Planorbarius* e *Lymnaea*, porque compreendem as espécies hospedeiras intermediárias de parasitas, com um importante papel em saúde humana e animal.

Assim, na **Tabela 1**, está descrita a posição sistemática dos diferentes géneros em estudo.

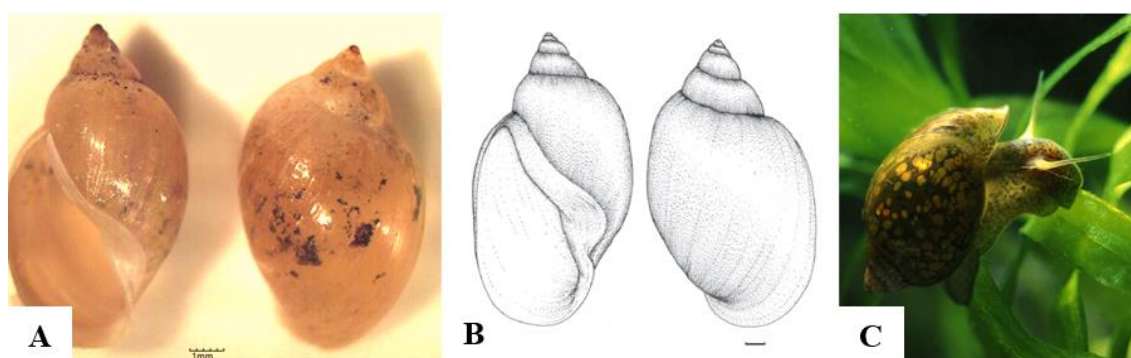
**Tabela 1** – Posição sistemática dos moluscos do género *Physa*, *Planorbarius* e *Lymnaea*  
(Adaptado de Brown, 1994)

<i>Physa</i> sp.	<b>Filo:</b> Mollusca <b>Classe:</b> Gastropoda <b>Subclasse:</b> Pulmonata <b>Ordem:</b> Basommatophora <b>Família:</b> Physidae <b>Género:</b> <i>Physa</i>
<i>Planorbarius</i> sp.	<b>Filo:</b> Mollusca <b>Classe:</b> Gastropoda <b>Subclasse:</b> Pulmonata <b>Ordem:</b> Basommatophora <b>Família:</b> Planorbidae <b>Género:</b> <i>Planorbarius</i>
<i>Lymnaea</i> sp.	<b>Filo:</b> Mollusca <b>Classe:</b> Gastropoda <b>Subclasse:</b> Pulmonata <b>Ordem:</b> Basommatophora <b>Família:</b> Lymnaeidae <b>Género:</b> <i>Lymnaea</i>



### 1.2.1. Género *Physa*, Draparnaud 1801

Os moluscos do género *Physa* (Draparnaud, 1801) apresentam uma concha em espiral com abertura para a esquerda (**Figura 3**), rádula com dentes a formar fileiras em forma de V, sem dentes laterais (Malek, 1980). São hermafroditas com a capacidade de autofecundação e podem encontrar-se em variadíssimos habitats de água doce, com uma distribuição alargada pelo mundo (Wethington, 1980). Apresentam uma elevada tolerância à poluição e são considerados uma espécie invasora, devido à sua alta taxa de reprodução e à grande capacidade migratória (Malek & Cheng 1974; Brown, 1994). O género está caracterizado como sendo hospedeiro intermediário de tremátodes digenéticos.

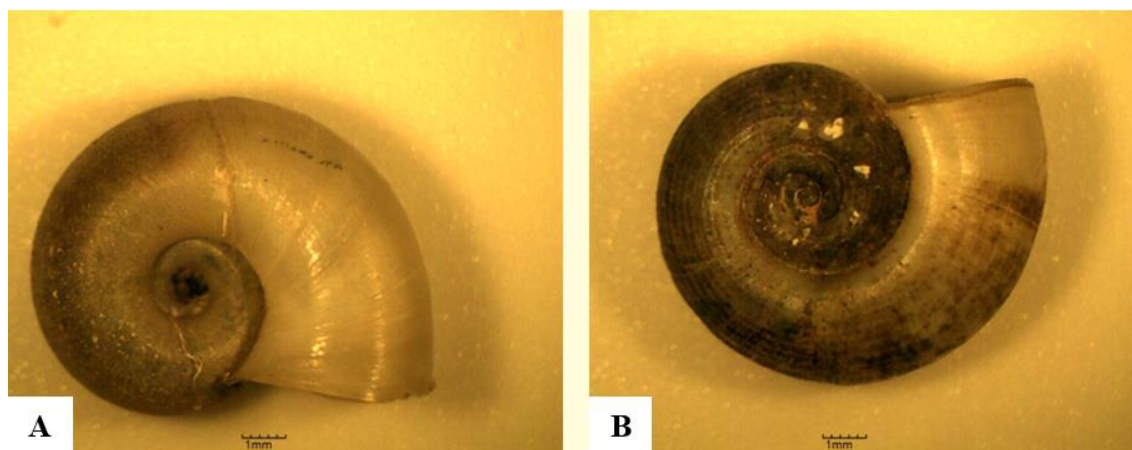


**Figura 3** *Physa acuta*; A – (Conchinha, 2015, IHMT – UEI PM/HMM); B – (adaptado de Paraense & Pointier, 2003); C – (Dillon 2006, <http://www.fwgna.org>)

### 1.2.2. Género *Planorbarius*, Fropier 1806

O género *Planorbarius* (Fropier, 1806) apresenta moluscos com conchas largas e discoides (**Figura 4**). Reportava-se este género como hospedeiro intermediário de *Schistosoma haematobium*, nomeadamente nas regiões do Algarve em Portugal (Malek & Cheng, 1974). O desenvolvimento ocorre em águas doces com vegetação rica a uma temperatura ideal de 19°C a 20°C e a pH entre os 6 e os 9. A reprodução ocorre na primavera e no outono e apresentam a capacidade de autofertilização (Animal Base).



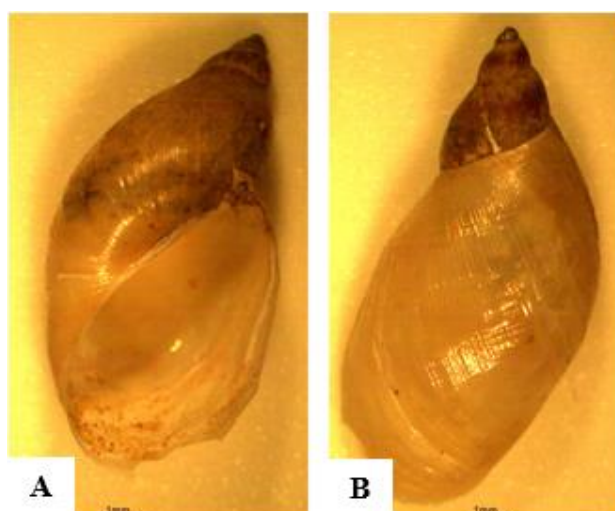


**Figura 4** *Planorbarius metidjensis*; A; B – (Conchinha, 2015, IHMT – UEI PM/HMM)

### 1.2.3. Género *Lymnaea*, Lamarck 1799

O género *Lymnaea* (Lamarck, 1799) caracteriza-se por apresentar moluscos com conchas ovaladas com abertura para a direita (**Figura 5**). A espira pode ser mais ou menos atenuada e pode variar em altura. A rádula apresenta dentes centrais unicúspides e dentes laterais bi ou tricúspides. Os moluscos do género *Lymnaea* são também identificados como hospedeiros intermediários de vários tremátodes como a *Fasciola hepatica* (Malek & Cheng, 1974).

Estes moluscos residem habitualmente em águas doces estagnadas ou de curso lento e possuem hábitos anfíbios (Ministério da Saúde Brasil, 2008).



**Figura 5** – *Lymnaea columella*; A; B – (Conchinha, 2015 - IHMT – UEI PM/HMM)

#### 1.2.4. Distribuição geográfica

Em Portugal, e segundo Augusto Nobre (1941), a espécie *Physa acuta* (Draparnaud, 1805) tem uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada nos mais diversos habitats, desde águas pouco correntes, tanques e valas ou até mesmo arrozais.

A espécie é comum em toda a América do Norte e Europa, a qual poderá ter iniciado a sua distribuição, primeiro nas regiões do Mediterrâneo, tendo posteriormente colonizado a região da Europa do Norte. É encontrada em países como a Bélgica, República Checa, Alemanha, Itália, entre outros.

Quanto à espécie *Planorbarius metidjensis* a distribuição geográfica é muito restrita, limitada a duas zonas do mediterrâneo: Mediterrâneo norte até à Península Ibérica e Mediterrâneo sul até Marrocos e Argélia (Brown, 1994). Em Portugal esta espécie tem uma ampla distribuição geográfica, podendo encontrar-se ao longo de todo o país (Nobre, 1941).

No que diz respeito à espécie *Lymnaea columella*, esta tem uma distribuição mundial tendo sido uma espécie introduzida na Europa (Remigio, 2002), podendo ser encontrada em vários países, nomeadamente Áustria, França, entre outros (Pontier *et al.*, 2007).

#### 1.2.5. Vigilância e controlo de moluscos

Observando nos moluscos uma grande importância na dispersão das parasitoses, o seu controlo tem-se mostrado difícil. Devido à sua capacidade de reprodução que é bastante elevada, à capacidade de repovoamento de novos habitats (efeito fundador), à resistência à dissecação, aos comportamentos de evasão e proteção, possibilitam um escape às medidas de controlo, cuja vigilância apresenta uma grande preocupação para as populações mais afetadas (Jumberg *et al.*, 1989; Souza & Lima, 1990).

Atualmente, as medidas estratégicas de controlo das parasitoses passam por aliar ao controlo dos hospedeiros intermediários, o controlo quimioterapêutico das populações infetadas em conjunto com medidas preventivas, como a educação para a saúde e o saneamento básico (Berquist, 2002; Brooker *et al.*, 2006; Fenwick *et al.*, 2006). Ainda

assim, o controle de moluscos é apenas recomendado na presença de um surto localizado ou quando existe a persistência de altas prevalências mesmo com os tratamentos periódicos da população (Ministério da Saúde do Brasil, 2008; Rey, 2008).

O controle dos moluscos continua ainda a ser o melhor método para a redução das parasitoses por tremátodes, uma vez que estes desempenham no ciclo de vida um importante papel. (Malek & Cheng, 1974; Brooker *et al.*, 2006).

### 1.3. Aplicação da biologia molecular ao estudo de moluscos

Durante várias décadas as descrições primordiais de moluscos baseavam-se apenas na observação de dados fenotípicos (análise das características morfologias das conchas e parte moles) que se mostraram insuficientes para distinguir espécies e subespécies (Malek & Cheng, 1974; Brown, 1994; Stothard *et al.*, 1997).

Uma das alternativas para quantificar a diversidade dos moluscos é a sua caracterização genética. Os marcadores genéticos são atualmente uma das principais ferramentas para descrever e caracterizar os padrões de variabilidade genética de uma população natural e ao mesmo tempo podermos quantificar a variabilidade intrapopulacional. (Singh, 1997; Grande *et al.*, 2004).

Das diferentes técnicas que são atualmente utilizadas nestas questões serão apresentadas as seguintes:

#### 1.3.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR), apresentada em 1988 por Kary Mullis veio revolucionar a análise e estudo de genes e o manuseamento do DNA. Através da reação é possível, com uma fração mínima de DNA, produzir uma quantidade apreciável de um determinado segmento. Esta técnica que apresenta uma elevada especificidade aliada a uma alta sensibilidade tem ainda como vantagens a simplicidade e o rigor. Uma vez que a especificidade é conseguida pelo par de primers colocado na reação, não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar. A segurança, rapidez e o facto de ser uma técnica de baixo custo, tornam-na numa excelente opção. Em termos de desvantagens está a necessidade de haver um conhecimento prévio sobre a sequência a amplificar para a construção dos primers, as possíveis contaminações que podem facilmente ocorrer e comprometer os resultados e ainda a possibilidade de ocorrerem ligações erradas das bases durante a replicação (Saiki *et al.*, 1985).

### 1.3.2. Marcadores moleculares

O avanço tecnológico tem vindo a permitir a utilização de novas técnicas moleculares no estudo das espécies de moluscos com importância em saúde humana e animal e desta forma também ajudar no combate as parasitoses (Rollinson *et al.*, 1998).

No estudo da variabilidade genética de moluscos destaca-se atualmente a utilização do DNA mitocondrial que tendo sido descoberto em 1960 é utilizado como forma de possibilitar o avanço no estudo da genética de populações, e como tal está também, atualmente, a ser utilizado nas populações de moluscos. Devido à sua taxa de evolução 10 vezes mais rápida que o DNA nuclear é um útil aliado para a diferenciação de microrganismos geneticamente semelhantes (Cooper & Hausman, 2007). x

No âmbito do estudo das populações de moluscos o estudo das regiões 16S e CO1 têm vindo a permitir um avanço no conhecimento da variabilidade morfológica.

## 1.4. Dermatites Cercarianas

A dermatite cercariana também conhecida como swimmer's itch é atualmente considerada uma parasitose (re)emergente, veiculada pela água (Verbrugge *et al.*, 2004), tendo como hospedeiros definitivos, aves e o homem. A ocorrência desta parasitose depende das condições favoráveis à transmissão do parasita, ou seja, das interações complexas entre os parasitas e os seus hospedeiros intermediários específicos (moluscos de água doce) e os hospedeiros definitivos (aves e mamíferos, incluindo o homem) (Golo *et al.*, 1998). Associada às atividades de lazer relacionadas com a água, tem sido descrita em vários países da Europa, nomeadamente, em Itália (Pilz *et al.*, 1995), Alemanha (Cerroni *et al.*, 1997) Áustria (Hertel *et al.*, 2002), Suíça (Combes, 1980), entre outros. Apresenta como agentes causais mais comuns as fases de cercária do género *Trichobilharzia*. Este género apresenta como hospedeiro definitivo as aves, sendo por isso considerada a schistosomose das aves, cujo ciclo de vida apenas é possível de completar com passagem pelo hospedeiro intermediário, um molusco de água doce (Soldánová *et al.*, 2013). O contacto e penetração da cercária (forma infetante para o hospedeiro definitivo), com a pele provocam uma severa reação alérgica que se manifesta por erupções maculopapulares e prurido intenso. Esta doença apresenta uma periodicidade sazonal, sendo mais comum nos meses cujas temperaturas são mais elevadas, devido às condições ótimas para libertação das cercárias, desenvolvimento dos moluscos e também devido ao facto de serem os meses em que os meios aquáticos são mais utilizados como locais recreativos (Kolářová *et al.*, 2013).

### 1.4.1. Etiologia

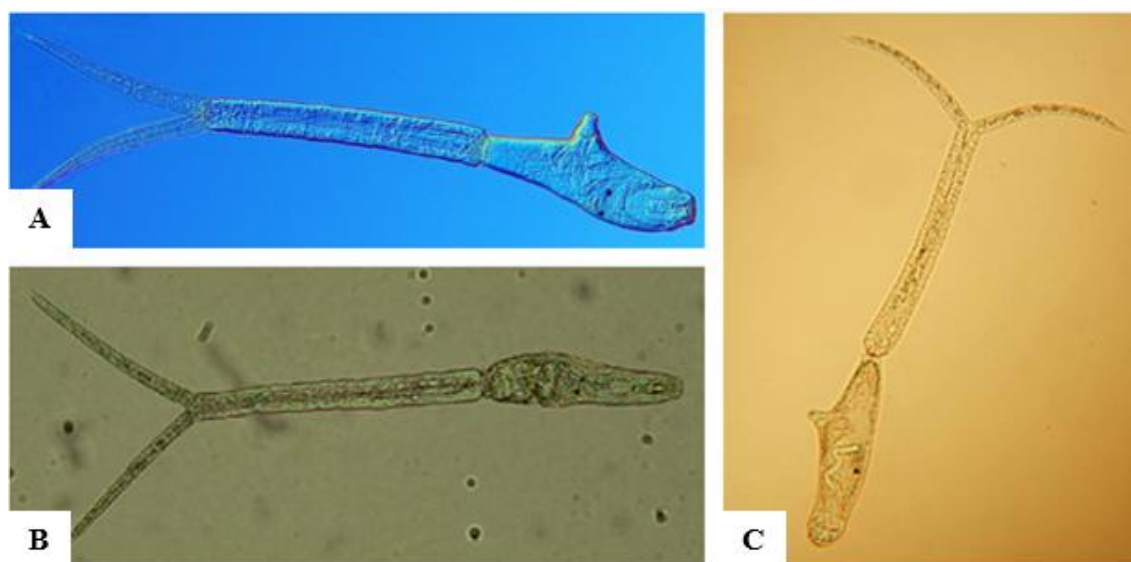
A primeira descrição da doença foi feita por Fujii em 1887 em plantadores de arroz, no entanto, é apenas em 1928 que Cort na América do Norte reconhece o agente causal da doença, existindo posteriormente vários relatos da mesma. (Selbach *et al.*, 2015)

A presença de dermatites cercarianas nos casos de schistosomose também pode ser verificada, no entanto os casos mais relatados são provenientes da penetração de cercárias de tremátodes da família Schistosomatidae que parasitam aves (Pinto *et al.*, 2012). Apesar de vários géneros que parasitam as aves, como os géneros *Allobilharzia*,

*Bilharziella*, *Dendritobilharzia*, *Gigantobilharzia*, serem encontrados em caracóis de água doce, confere-se, atualmente, ao género *Trichobilharzia*, a principal responsabilidade na dispersão da parasitose na Europa (Kolářová *et al.*, 2013). A dispersão das cercárias está inteiramente relacionada à dispersão dos caracóis, hospedeiros intermediários deste género.

As cercárias não se alimentam, têm um tempo de vida reduzido, cerca de 1 a 1,5 dias e uma temperatura ótima de desenvolvimento a rondar os 24°C. A sua morfologia é composta por um corpo e uma cauda bifurcada, como é possível de verificar pela **Figura 6**, apresentando em média 1,2 mm de comprimento. Possuem a capacidade de procurar ativamente e penetrar na pele de vários vertebrados, incluindo o homem (Kolářová *et al.*, 2013).

A infecção dos caracóis pelos miracídios (forma infetante para o molusco) ocorre maioritariamente nos meses de verão, onde a temperatura da água é mais elevada. As cercárias que possuem características fototrópicas nadam até à superfície da água com o objetivo de infetar as aves aquáticas, que são identificadas através do gradiente térmico que se verifica com base na temperatura corporal e pelos lípidos libertados da pele. O contacto e penetração com a pele de mamíferos têm também por base estes estímulos físicos e químicos (Fraser *et al.*, 2009).

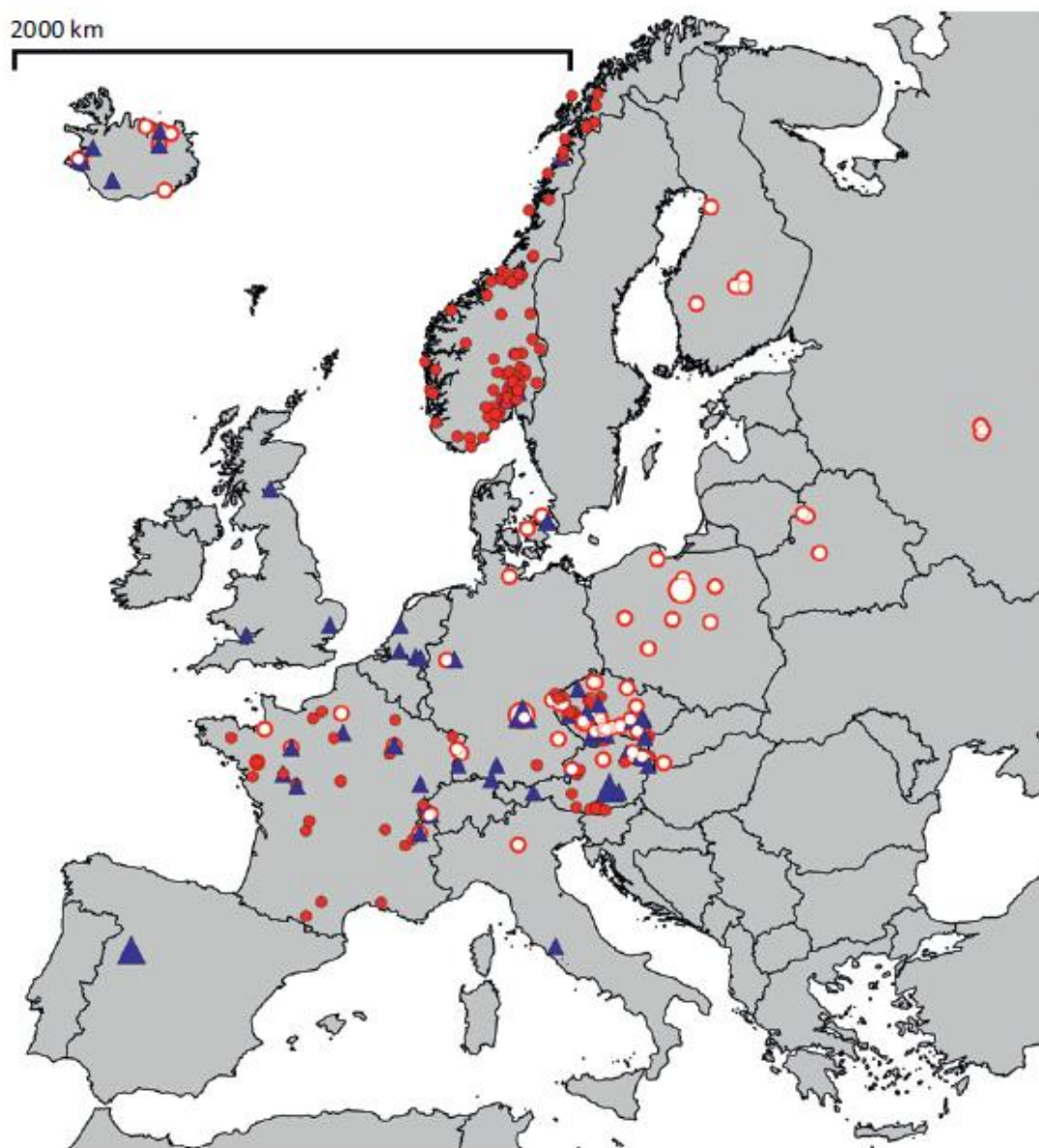


**Figura 6** **A** – Cercária de *T. franki* (Selbach *et al.*, 2015); **B** – Cercária de *T. szidati* (<http://www.helminths.at/>); **C** – Cercária de *T. ocellata* (<http://www.weichtiere.at/>)

### 1.4.2. Distribuição geográfica

Esta parasitose encontra-se presente, com casos reportados, em todos os continentes com exceção da Antártida (CDC). É uma parasitose recorrente e endémica nos países temperados e tropicais (Gentile *et al.*, 1996). Na Europa a distribuição é uniforme, incluindo as áreas mais frias e com maior altitude. A presença dos caracóis, especialmente as famílias Lymnaeidae e Planorbidae e a sua dispersão também por toda a Europa permite a dispersão da parasitose. O mapa da distribuição, segundo Soldánová (2013), pode ser observado na **Figura 7** onde se verificam os casos reportados de dermatite cercariana e os casos de schistosomose aviária. A especificidade parasita-hospedeiro que se acreditava ser elevada tem vindo a ser verificada como menor ao longo de estudos que mostram a população de moluscos, em geral, infetada e o número de casos de schistosomose aviária (Soldánová *et al.*, 2013).





Legenda:

- ▲ - Locais confirmados com a presença de schistosomose aviária e de dermatites cercarianas
- - Locais confirmados com a presença de schistosomose aviária
- - Locais confirmados com a presença de dermatites cercarianas

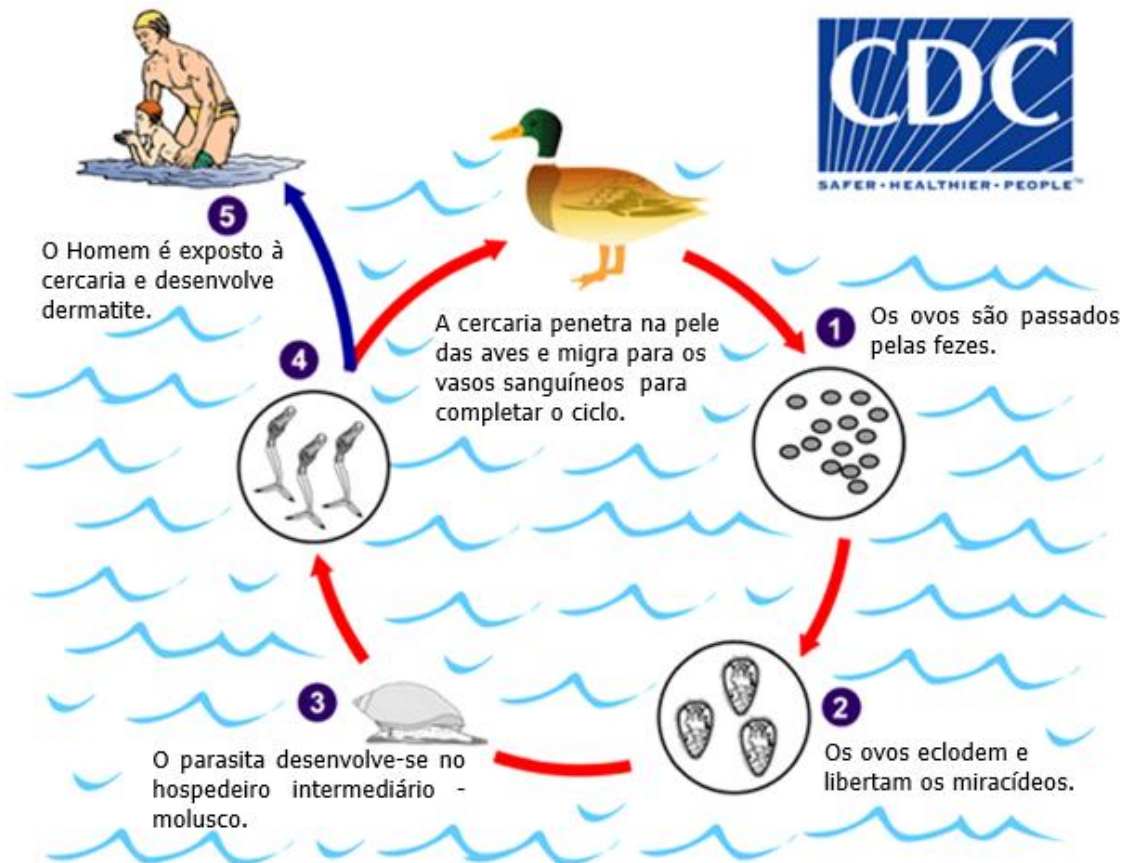
**Figura 7** – Ocorrência de schistosomose aviária e casos de dermatite cercariana reportados na Europa. (Soldánová *et al.*, 2013)

### 1.4.3. Ciclo biológico e de transmissão

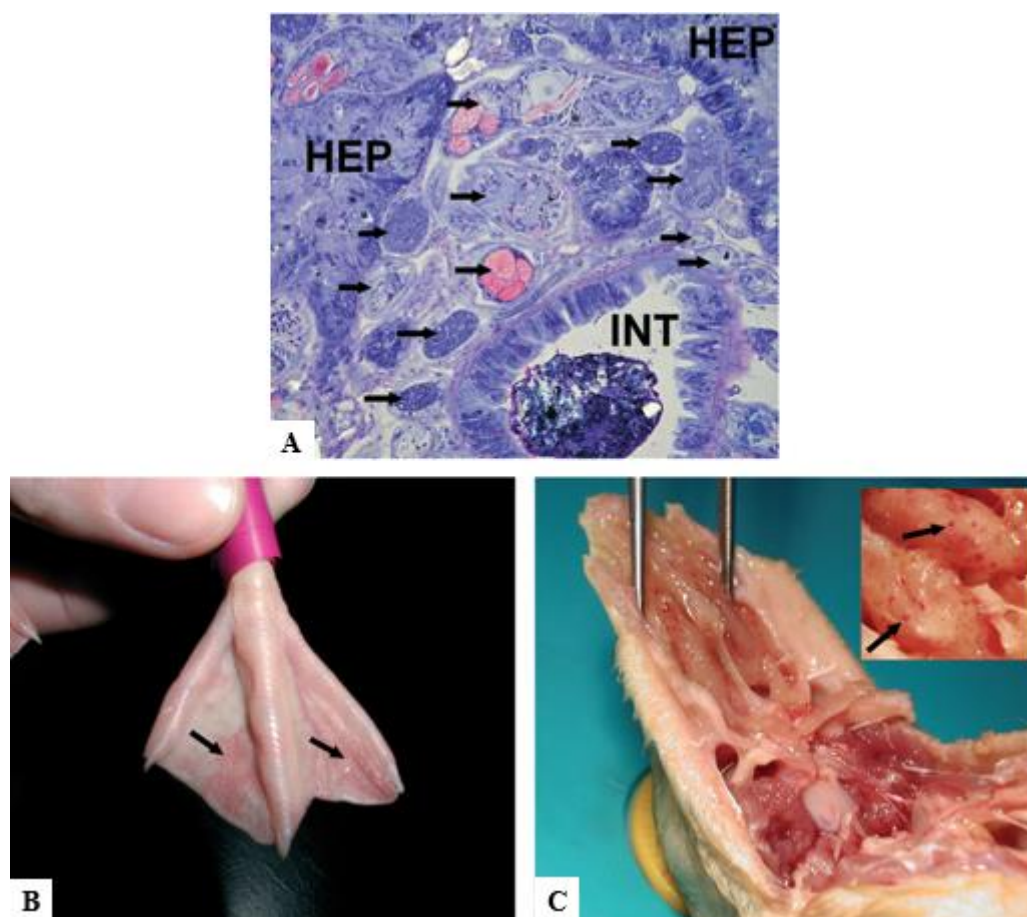
A Schistosomose aviária apesar de ter um maior desenvolvimento nos meses de verão pode ser encontrada em todo o ano. Os parasitas têm como hospedeiros definitivos as aves, tanto as residentes como as aves migratórias.

Na **Figura 8** pode verificar-se o ciclo de vida e de transmissão do parasita:

1. Os parasitas adultos que se encontram nos vasos sanguíneos das fossas nasais das aves produzem ovos que são expelidos nas fezes das aves e que eclodem em contacto com a água.
2. Dos ovos eclodem os miracídeos que vão posteriormente através da água infectar os hospedeiros intermediários que será sempre um caracol de água doce.
3. No caracol o parasita desenvolve-se até a forma de cercária e mediante estímulos externos, nomeadamente a luz solar, é libertado para a água (**Figura 9 A**).
4. A cercária possui uma capacidade natatória devido à existência de uma cauda bifurcada. Desta forma penetra na pele das aves (**Figura 9 B**) migrando posteriormente através dos vasos sanguíneos para as fossas nasais onde termina o seu desenvolvimento e completa o ciclo (**Figura 9 C**).
5. O Homem apresenta-se como hospedeiro acidental; a cercária pode penetrar na pele humana mas não se desenvolve, existindo uma reação imunitária na zona do contacto com o objetivo de eliminar o parasita, desta reação surgem as erupções cutâneas (CDC).



**Figura 8** – Ciclo de vida da schistosomose aviária e da dermatite cercariana  
(Adaptado de CDC)



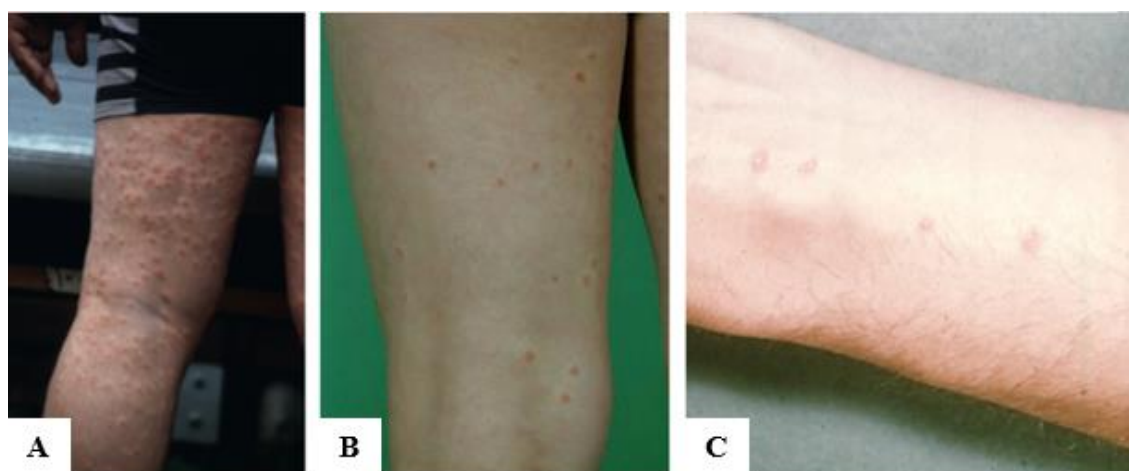
**Figura 9** **A** – Desenvolvimento de larva de *Trichobilharzia szidati* no hospedeiro intermediário, *Lymnaea stagnalis*. HEP – Tecido do Hepatopâncreas, INT – Tecido do intestino; **B** – Pata de pato mostrando a penetração das cercárias; **C** – Cavidade nasal de pato mostrando petéquias na mucosa provocadas pelo parasita (Horák & Kolářová, 2011)

#### 1.4.4. Patologia, Sintomatologia e Tratamento

A parasitose apresenta um problema de saúde pública por todo o mundo, sendo exemplo disso as variadíssimas formas de denominar a doença ao redor do globo, como “koganyo” no Japão, “sawah itch” na Indonésia, “puces de canard” na Suíça, “entenbilharziose” ou “wasserhibbel” na Alemanha e Áustria e “sedge pool itch” nos EUA. Encontra-se atualmente como uma parasitose reemergente e de extrema importância para o Homem (Soldánová *et al.*, 2013).

O diagnóstico parte principalmente dos sintomas e não da análise laboratorial dos parasitas. Ainda que rara a pesquisa de cercárias em caracóis coletados das áreas presumivelmente infetadas é também um meio de confirmação da existência da doença (CDC).

A denominação dermatite advém precisamente da reação inflamatória que ocorre na pele devido à penetração das cercárias. As lesões maculopapulares e o prurido, que podem ser observadas na **Figura 10**, despoletam uma reação alérgica com a libertação de histamina e outros mediadores inflamatórios.



**Figura 10** – Casos de Dermatite cercariana; **A** - (Soldánová *et al.*, 2013);  
**B** – (Fraser *et al.*, 2009); **C** – (CDC)

A parasitose apresenta uma sintomatologia de curta duração, podendo apresentar casos assintomáticos ou casos de reação local que se manifestam cerca de uma hora após a exposição ao parasita. Existem, no entanto, registo de casos mais complexos com a evolução da doença que pode vir a evoluir para quadros de linfangite, adenopatias

regionais ou ainda a predominância de lesões secundárias com características postulares. A intensidade e a duração dos sintomas dependem da sensibilidade de cada indivíduo (Pinto *et al.*, 2012).

Uma vez que a evolução da doença tende a apresentar uma cura espontânea dentro de uma a duas semanas, o tratamento, nos casos gerais, poderá passar apenas por uma boa higiene e evitar coçar as regiões afetadas. Nos casos mais persistentes estão indicados anti-histamínicos e/ou corticosteroides para alívio dos sintomas. Caso se verifiquem infecções secundárias é também aconselhado o uso de antissépticos e antibióticos (CDC).

Burkhart e Burkhart (2003) propõem a utilização de ivermectina a nível sistémico para o controlo da parasitose, bem como para a erradicação de possíveis schistosomulas que se alojem nos diferentes órgãos e que podem sobreviver nos mesmos durante alguns dias.

## 1.5. O impacto das alterações climáticas

Os fatores que poderão estar associados ao surgimento de infeções humanas causadas por schistosomose ainda não estão completamente esclarecidos. Contudo, muitos autores sugerem que o aquecimento global, a elevada eutrofização das águas dos reservatórios, a colonização de lagoas por caracóis suscetíveis ao parasita e pela luz solar no verão, poderão ser fatores importantes que levaram a um recente aumento do número de casos em todo o mundo, principalmente onde as aves migratórias se tornaram sedentárias (Golo *et al.*, 1998).

A relação das parasitoses com as condições climáticas é há muito conhecida, bem como a sua capacidade de alterar a expressão e intensidade do parasitismo. Crê-se que a mudança climática atual irá afetar a distribuição e sobrevivência de vetores e hospedeiros intermediários dos vários parasitas (Mas-Coma *et al.*, 2009).

No que respeita aos tremátodes as condições climáticas influenciam diretamente o desenvolvimento do próprio parasita nas várias fases, bem como indiretamente ao nível dos hospedeiros intermediários. Pequenos aumentos na temperatura do ar e da água previstos por muitos modelos do clima, não só irão influenciar a distribuição geográfica de algumas doenças, mas também poderão promover a proliferação dos estádios infetantes em muitos ecossistemas (Poulin, 2006).

O clima tem uma relação muito importante no desenvolvimento e dispersão da dermatite cercariana. Uma vez que é o clima o responsável pela migração das aves, o aumento da temperatura permite às aves o seu sedentarismo fazendo com que as mesmas se fixem nos lagos da Europa central. Esta problemática afeta também a transmissão da parasitose que aliada ao aumento da produção de cercárias, devido ao aumento da temperatura, proporciona uma maior oportunidade para contrair a doença (Mas-Coma *et al.*, 2008).

## **1.6. O papel dos Sistemas de Informação Geográfica (SIG) no estudo das parasitoses**

Os Sistemas de Informação Geográfica (SIG) são sistemas de informação que permitem a análise e gestão do espaço, bem como de fenómenos que nele ocorram.

Segundo Burrough e McDonnel (1998) os SIG são uma estrutura de extrema importância para a viabilização do geoprocessamento, com a possibilidade da criação de mapas politemáticos com dados qualitativos e quantitativos, reformulações e sínteses sobre os dados disponíveis. (Coelho, 2009)

No estudo das parasitoses os SIG são uma ferramenta em expansão que permite através dos fatores do meio estudar a presença e/ou a ausência dos hospedeiros intermediários, bem como dos parasitas ou até mesmo dos hospedeiros definitivos. Através desta funcionalidade é possível a criação de modelos preditivos que apresentam a possibilidade de perceber a importância dos vários constituintes do ciclo de vida dos parasitas, com base nos fatores estudados e nas alterações esperadas.

Estudos como os realizados por Phillips *et al.* (2006); Pereira (2011) e Schotle *et al.* (2012); (2014) vêm corroborar o acima exposto e apresentar dados conclusivos para a utilização destes modelos para o estudo das parasitoses.



## 2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como principal objetivo proceder a uma caracterização bioecológica da albufeira do Alqueva incluindo a sua fauna malacológica, tendo em conta as alterações climáticas e ambientais.

Para a realização deste objetivo foram delineados os seguintes objetivos secundários:

- a) Levantamento malacológico com vista a apurar e caracterizar os habitats;
- b) Identificar as espécies de moluscos existentes e avaliar o seu comportamento face à infeção natural por tremátodes com importância na saúde humana e veterinária;
- c) Caracterizar com o apoio das técnicas moleculares as populações de moluscos colhidos na albufeira do Alqueva;
- d) Estimar a probabilidade da distribuição geográfica dos moluscos e prever a distribuição potencial do risco de futuras parasitoses, com recurso a Sistemas de Informação Geográfica.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Colheita e identificação dos moluscos

A colheita dos moluscos realizou-se entre outubro e dezembro de 2014. Os pontos de água foram selecionados com base nas acessibilidades e tendo em conta os locais mais utilizados como zonas recreativas pela população. As diferentes colheitas foram elaboradas segundo o método de captura por indivíduo, em espaço e tempo determinado, sendo que o tempo estimado foram 15 minutos e em termos espaciais foram feitas colheitas num raio de 250 m.

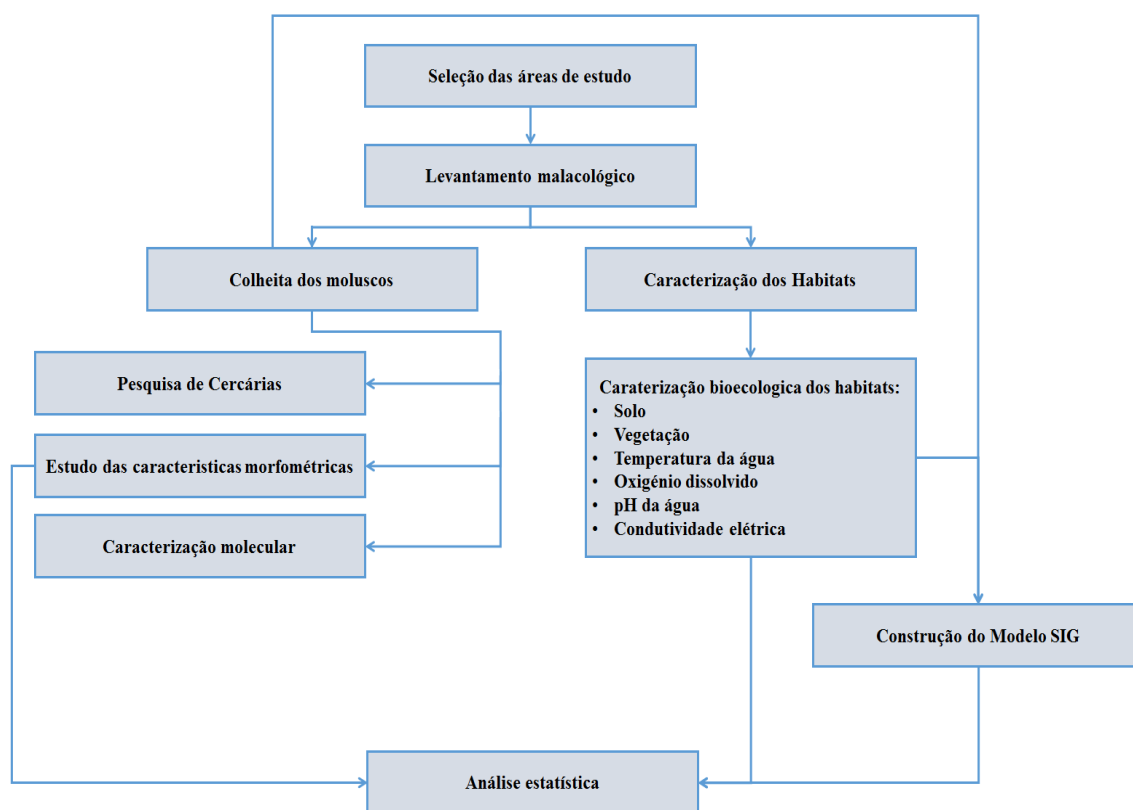
Para cada ponto estudado foi registado na ficha de campo utilizada pelo grupo de Malacologia da UEI PM/HMM (**Anexo I**), as diferentes características do criadouro que têm influência sobre a dispersão e fixação dos moluscos ao habitat, nomeadamente os tipos de vegetação, de substratos, a exposição solar, o contacto com o homem e com outros animais; bem como as variáveis temperatura da água (**T°C**) e o pH da água (**pH**) medidos no pH/mv/°C Meter ph10series da Oakton Instruments®, a condutividade elétrica (**Ce  $\mu$ S/cm**) medida no CyberScan COM 11 da Eutech Instruments® e a oxigenação da água (**O<sub>2</sub> mg/L**) medida no EcoScan DO 6 da Eutech Instruments®. Para cada local foi confirmada a presença ou ausência de moluscos, contabilizado o número total de moluscos colhidos e analisadas as diferentes espécies capturadas. Foram ainda recolhidas as coordenadas do local com recurso a GPS Meridian da MAGELLAN® utilizando o sistema de coordenadas geográfico WGS84.

Os moluscos foram colhidos das margens da albufeira com recurso a pinça e foram armazenados em caixas com água e vegetação do habitat e posteriormente trazidos para

o laboratório para serem efetuados, de acordo com o plano de trabalho, a identificação, a pesquisa de eventuais infecções naturais por diferentes espécies de tremátodes e ainda para estudos moleculares.

A identificação dos moluscos foi possível com recurso à observação das características morfológicas dos mesmos e segundo a classificação apresentada por Malek & Cheng (1974).

A **Figura 11** apresenta o diagrama com o desenho experimental do estudo efetuado.



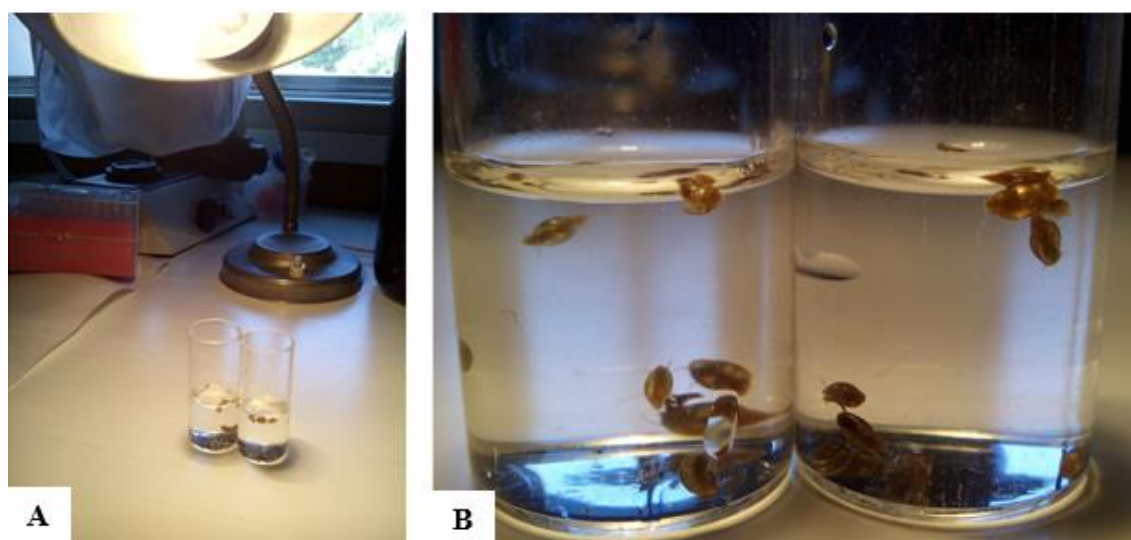
**Figura 11** – Diagrama do estudo efetuado

### 3.2. Pesquisa de cercárias

Com vista a observar se os moluscos colhidos se encontravam parasitados foi feita uma pesquisa de cercárias com recurso à exposição à luz (**Figura 12**). Os moluscos colhidos foram colocados em tubos de Willis com um volume de 10 ml de água desclorada e expostos a um foco de luz durante cerca de duas horas separados por géneros. A visualização das cercárias foi feita através do microscópio estereoscópico. Este procedimento foi repetido para os moluscos de cada habitat estudado.

Os moluscos parasitados foram sacrificados com a colocação em etanol a 95% e armazenados a uma temperatura de 4°C para estudos posteriores. O mesmo procedimento foi feito para as cercárias e guardadas a -20°C.

Os moluscos que não mostraram indícios de parasitas foram novamente armazenados nas caixas e alimentados com o objetivo de se repetir o procedimento sensivelmente uma semana depois. Os exemplares que, ainda assim, não libertaram cercárias foram sacrificados e armazenados em etanol a 95% a uma temperatura de 4°C para estudos posteriores.



**Figura 12** – Exposição dos moluscos à luz para verificar a libertação de cercárias;

**A; B** – (Conchinha, 2015 - IHMT – UEI PM/HMM)

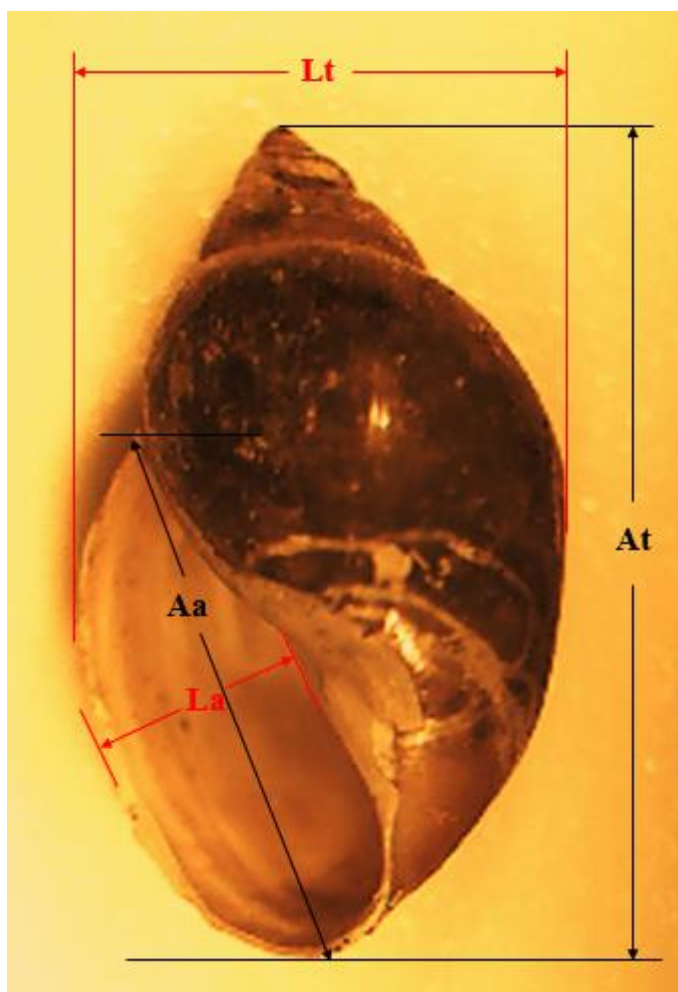
### 3.3. Dissecção dos moluscos

Para a dissecção dos moluscos foram escolhidos de forma aleatória exemplares do género *Physa* de cada habitat estudado.

De cada caracol dissecado foi recolhida a zona da cabeça e a zona do hepatopâncreas e armazenadas ambas as amostras a -20°C em etanol a 95% com a vista a serem utilizadas em estudos moleculares. Devido às dimensões de alguns exemplares e/ou à deterioração das estruturas internas não foi possível separar estas estruturas em todos os exemplares utilizados como amostras, neste caso foi armazenada a totalidade do molusco.

### 3.4. Características morfométricas das conchas

Dos exemplares colhidos nos diversos habitats foram estudadas morfometricamente apenas as conchas dos moluscos do género *Physa* devido ao grande número de exemplares colhidos. Foram analisadas as conchas dos moluscos colhidos, excluindo as que foram destruídas no processo de disseção ( $n = 463$ ). A análise foi feita com base nos seguintes parâmetros: altura total da concha (**At**), altura da abertura (**Aa**), largura total (**Lt**) e largura da abertura (**La**). Com os parâmetros obtidos foi feita a relação entre **At/Lt**; **Aa/La**; calculadas a média, mediana, desvio padrão, variância, largura máxima e largura mínima, segundo a metodologia utilizada por Azevedo *et al.* (1961) e Sensen (2002). A representação esquemática das dimensões estudadas está apresentada na **Figura 13**.



**Figura 13** – Esquema das medições de um exemplar do género *Physa*

### 3.5. Análise de dados

A análise dos dados foi efetuada com recurso a métodos estatísticos utilizando os softwares SPSS da IBM® versão 23.0, Microsoft Office Excel 2013 e QGIS versão 2.4.0.

Para a análise das características morfométricas foram utilizadas as médias dos diferentes parâmetros – **At**, **Aa**, **Lt** e **La**. Os estudos efetuados debruçaram-se sobre as relações entre as diferentes medidas e os habitats, utilizando para isso a função Cluster hierárquico e com recurso à matriz de proximidade utilizando a distância euclidiana quadrática. O dendograma foi contruído, mostrando a forma de combinação dos “clusters”.

No estudo das variáveis ambientais – **T**, **O<sub>2</sub>**, **pH**, **Ce**, **Vegetação na água**, **Substrato e Exposição Solar** foi efetuada uma primeira análise às estatísticas descritivas com o intuito de obter informação sobre a média, máximos e mínimos, desvios padrão e variância das mesmas. Foram criados os boxplots das variáveis acima descritas e também as retas de regressão linear para confirmar o comportamento das variáveis face à presença e ausência de moluscos e aos totais de moluscos capturados, respetivamente. Por último foram estabelecidas as correlações entre estas variáveis utilizando o coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) disponível no SPSS versão 23.0.

### **3.6. Caracterização molecular**

#### **3.6.1. Extração de DNA Genómico**

A extração do DNA dos caracóis colhidos foi feita segundo o método descrito por Stothard *et al.* (1996), com as seguintes alterações: aos tubos que continham as amostras da cabeça e do hepatopâncreas foi adicionado 600µL de tampão CTAB (brometo de hexadeciltetrametilamónio) e 10µL de proteinase K. Para que todas as amostras ficassem dissolvidas no tampão foi feita uma homogeneização das mesmas e posteriormente colocadas na estufa a 55°C durante 90 minutos com uma agitação de 15 em 15 minutos. Passados os 90 minutos foi adicionado a cada tubo 600µL clorofórmio/isoamyl (24:1) e agitaram-se por inversão os tubos durante 2 minutos. Depois de uma centrifugação rápida, para uma correta separação da fase aquosa e da fase orgânica, foi retirada a fase aquosa para novos tubos contendo previamente 800µL de etanol a 4°C. Os novos tubos foram centrifugados durante 20 minutos a 13000rpm e posteriormente retirado o sobrenadante. De seguida foi adicionado ao pellet 500µL de etanol a 70% e foi feita uma nova centrifugação nas mesmas condições que a anteriormente descrita. O sobrenadante foi novamente decantado e os tubos contendo o pellet colocados na estufa a 55°C num máximo de 15 minutos para a total evaporação do etanol. Por último foi adicionado a cada tubo 50µL de tampão TE (Tris EDTA, pH 7) e agitados para completa dissolução do pellet. Os produtos da extração foram armazenados a -20°C.

#### **3.6.2. Quantificação do DNA Genómico**

De forma a poder confirmar a existência de DNA e os valores totais presentes em cada tubo obtido depois da extração, procedeu-se à quantificação do mesmo através do espectrofotómetro NanoDrop<sup>TM</sup>. Os dados foram registados e procedeu-se posteriormente a uma diluição de 1/10 em todas as amostras de forma a obter quantidades de DNA que permitissem a sua posterior amplificação.



### 3.6.3. Amplificação do DNA Genômico

Para uma correta visualização do DNA e para a sua possível amplificação, com base na informação obtida através da sua quantificação foram efetuadas diluições de 1/50 nas amostras em estudo. A amplificação foi efetuada através da reação de PCR. No que diz respeito aos moluscos a amplificação foi aplicada nas regiões 16S e CO1 do mtDNA que codificam para a subunidade menor do RNA ribossomal e para a subunidade I do Citocromo C Oxidase, respetivamente. O gene 16S foi amplificado com recurso aos primers L2510 e H3080 (Palumbi *et al.* 1991) e o gene CO1 foi amplificado com recurso aos primers LCO1490 e HCO2198 (Folmer *et al.* 1994). Os primers encontram-se descritos na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Sequências de primers aplicados para o estudo das regiões 16S e CO1

Gene	Primers	Sequência	Autor
16S	L2510	5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'	(Palumbi <i>et al.</i> 1991)
	H3080	5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'	
CO1	LCO1490	5'-GG TCA ACA AAT CAT AAA GAT ATT GG-3'	(Folmer <i>et al.</i> 1994)
	HCO2198	5'-TGA TTT TTT GGT CAC CCT GAA GTT TA - 3'	

As reações de amplificação tanto da região 16S como da região CO1 foram efetuadas em volumes de 25µL. Para tal foi utilizado o kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase da Promega© contendo 5X green GoTaq® flexi buffer, MgCl<sub>2</sub> [25mM], PCR nucleotide mix [10mM] e GoTaq® DNA polymerase [5u/µL]. Ao kit foram adicionados os volumes correspondentes dos primers específicos, o DNA em estudo e H<sub>2</sub>O para perfazer o volume total. Em cada reação foi sempre colocado um controlo negativo que não possuía DNA e um controlo positivo já anteriormente testado e que se sabia que possuía DNA da região a amplificar. As reações decorreram num termociclador AVISO®, GmbH Machatronic Systems.

Os programas utilizados para a obtenção de resultados foram os indicados na **Tabela 3** segundo a metodologia de Wethington *et al.* (2009).

**Tabela 3** – Condições do PCR na amplificação das regiões 16S e CO1

Gene	Etapas do ciclo	T/h	Nº ciclos
16S	Desnaturação inicial	92°C/2min	1
	Desnaturação	92°C/40seg	35
	Hibridação	52°C/60seg	
	Extensão	68°C/90seg	
	Extensão final	72°C/10min	1
CO1	Desnaturação inicial	92°C/2min	1
	Desnaturação	92°C/40seg	35
	Hibridação	50°C/60seg	
	Extensão	68°C/90seg	
	Extensão final	72°C/10min	1

Com o objetivo de poder observar os produtos do PCR e confirmar a existência de amplificação, os mesmos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE com brometo de etídio numa concentração de 0,5 µg/mL. Foi ainda adicionado um marcador de massa molecular “HyperLadder II” comercializado pela Bioline<sup>TM</sup> com 1000 pares de bases. A migração ocorreu a 120V, durante cerca de 20 minutos. O resultado da migração foi observado sob radiação UV por emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado no DNA numa cabine AlphaImager®HP, AlphaInnotech.

### 3.6.4. Sequenciação do DNA Genómico

Os produtos de PCR foram purificados com recurso ao kit comercial e de acordo como o protocolo DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup> -5 da ZYMO RESEARCH CORP. Os produtos de PCR amplificados e purificados foram enviados para o serviço de sequenciação de GATC Biotech (Sanger). As sequências nucleóticas parciais obtidas para os genes CO1 e 16S foram analisadas através do programa BLAST® do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), permitindo a pesquisa de sequências homólogas disponíveis na base de dados GenBank. Os alinhamentos das sequências foram efetuados com recurso ao programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw>) (Tompson *et al.*, 1994), com ajustes introduzidos manualmente. Foi também utilizado o programa MEGA 5 (Kumar *et al.*, 2004). A estimativa do número médio da diferença

nucleotídica (**K**), a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e a diversidade haplotípica (**Hd**) foram analisadas com o apoio do programa DnaSP 5.1 (Rozas *et al.*, 2003)

### **3.7. Construção do modelo SIG**

Para a construção dos SIG (Sistemas de Informação Geográfica) foi utilizada a ferramenta informática QGIS versão 2.4.0. Com recurso aos dados dos limites da albufeira do Alqueva foi possível a criação da imagem geográfica da Albufeira. A estes dados foram incorporados os habitats sendo, para isso, colocadas as informações da latitude e longitude registadas anteriormente no sistema geográfico WGS84. A cada um destes habitats observados, foi também incorporado o valor que correspondia às variáveis temperatura, pH, condutividade térmica e oxigénio dissolvido.

A primeira abordagem iniciou-se com o estudo de cada uma das variáveis com recurso à interpolação das variáveis recorrendo ao método do inverso da distância, de forma a ser possível observar a variação e a dispersão dos valores das variáveis nos habitats.

Seguidamente foi efetuado um estudo mais detalhado com base nas quatro variáveis e com recurso a um modelo de máxima entropia – MaxEnt, que tem por base a presença dos moluscos de forma a aferir que a ocorrência dos mesmos não terá sido aleatória, de forma a poder validar os dados obtidos.

## 4. Resultados

### 4.1. Colheita dos moluscos

Durante o levantamento malacológico foram identificados 18 habitats. Para facilitar a sua diferenciação os mesmos foram identificados de **A a S**.

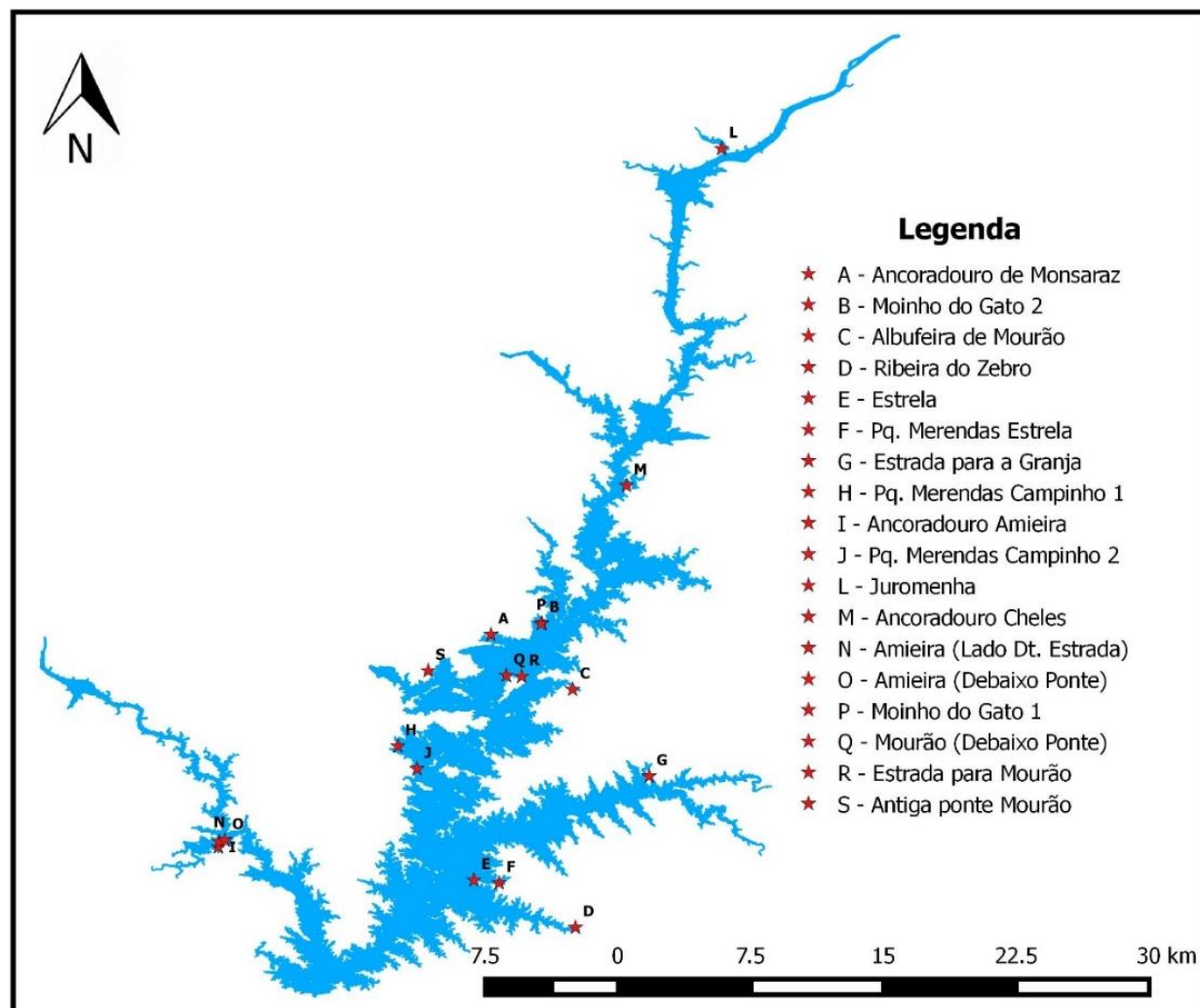
Nos 18 habitats observados a presença de moluscos foi observada em 14, designadamente no **ancoradouro de Monsaraz (A)**; no **Moinho do Gato, local 2 (B)**; na **albufeira de Mourão (C)**; na **ribeira do Zebro (D)**; em **Estrela (E)**; no **parque de merendas da Estrela (F)**; na **estrada para a Granja (G)**; no **parque de merendas do Campinho, locais 1 e 2 (H), (J)**; no **ancoradouro da Amieira (I)**; em **Juromenha (L)**; no **ancoradouro de Cheles (M)**; no **lado direito da estrada para a Amieira (N)**; e **debaixo da ponte da Amieira (O)**.

Foi ainda feita a pesquisa de moluscos no **Moinho do Gato, local 1 (P)**; **debaixo da ponte de Mourão (Q)**; na **estrada para Mourão (R)**; e na **antiga ponte de Mourão (S)**. Nestes locais a pesquisa não apresentou resultados para a presença de moluscos.

Na **Tabela 4** estão identificados os habitats acima indicados com as diferentes referências geográficas e no mapa da **Figura 14** estão representados os mesmos e a sua localização ao longo da albufeira do Alqueva. Nas imagens da **Figura 15** poderão ser observados os diferentes habitats onde foram colhidos os moluscos.

**Tabela 4** – Identificação dos habitats

	Habitat	Localidade	Concelho	Distrito	Lat (°N)	Long (°O)	Total moluscos
<b>A</b>	Ancoradouro Monsaraz	Monsaraz	Reguengos de Monsaraz	Évora	38,42788	-7,38367	37
<b>B</b>	Moinho do Gato 2	Telheiro	Reguengos de Monsaraz	Évora	38,43530	-7,35086	21
<b>C</b>	Albufeira de Mourão	Mourão	Mourão	Évora	38,39251	-7,33101	18
<b>D</b>	Ribeira do Zebro	Póvoa de São Miguel	Moura	Beja	38,23895	-7,32922	43
<b>E</b>	Estrela	Estrela	Moura	Beja	38,26947	-7,39464	22
<b>F</b>	Pq. Merendas Estrela	Estrela	Moura	Beja	38,26766	-7,37840	56
<b>G</b>	Estrada para a Granja	Granja	Mourão	Évora	38,33652	-7,28162	24
<b>H</b>	Pq. Merendas Campinho 1	Campinho	Reguengos de Monsaraz	Évora	38,35593	-7,44370	33
<b>I</b>	Ancoradouro Amieira	Amieira	Portel	Évora	38,29087	-7,55948	58
<b>J</b>	Pq. Merendas Campinho 2	Campinho	Reguengos de Monsaraz	Évora	38,34126	-7,43139	78
<b>L</b>	Juromenha	Juromenha	Alandroal	Évora	38,74143	-7,23494	69
<b>M</b>	Ancoradouro Cheles	Cheles	Cheles	Badajoz	38,52406	-7,29627	71
<b>N</b>	Amieira (Lado Dt. Estrada)	Amieira	Portel	Évora	38,29444	-7,55888	46
<b>O</b>	Amieira (Debaixo Ponte)	Amieira	Portel	Évora	38,29527	-7,55527	6
<b>P</b>	Moinho do Gato 1	Telheiro	Reguengos de Monsaraz	Évora	38,43484	-7,35134	0
<b>Q</b>	Mourão (Debaixo ponte)	Mourão	Mourão	Évora	38,40155	-7,37380	0
<b>R</b>	Estrada para Mourão	Mourão	Mourão	Évora	38,40090	-7,36388	0
<b>S</b>	Antiga ponte Mourão	Mourão	Mourão	Évora	38,40459	-7,42415	0
<b>TOTAL</b>							<b>582</b>

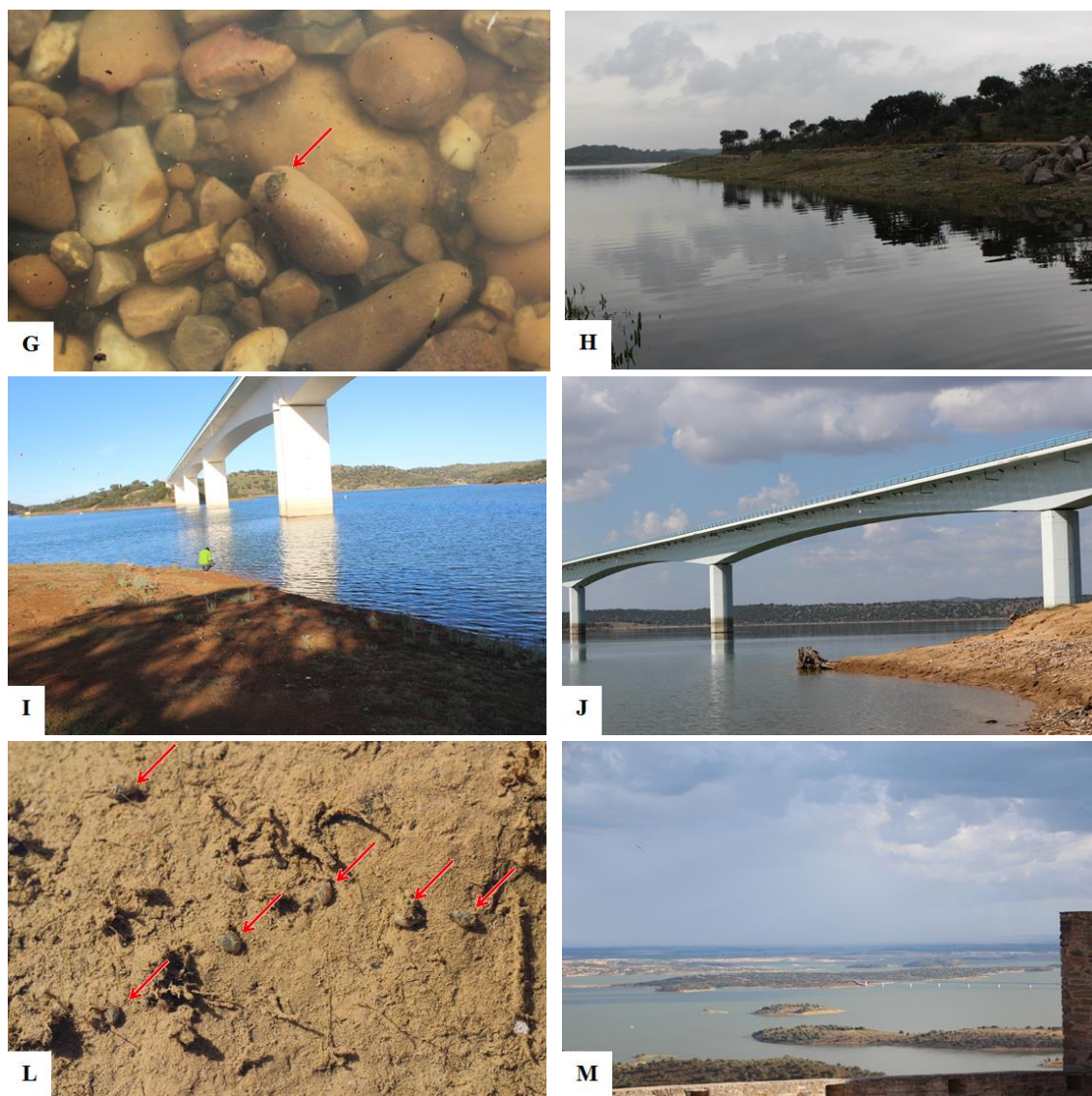


**Figura 14** – Mapa da albufeira do Alqueva com identificação dos habitats em estudo



**Figura 15** **A** – ancoradouro de Monsaraz; **B** – albufeira de Mourão; **C** – colheita de moluscos no parque de merendas da Estrela; **D** – Granja; **E** – ancoradouro da Amieira; **F** – parque de merendas do Campinho;





**Figura 15 (cont.)** **G** – molusco da espécie *Physa acuta* em Juromenha; **H** – ancoradouro de Cheles; **I** – Amieira (debaixo da ponte); **J** – Mourão (debaixo da ponte); **L** – moluscos da espécie *Physa acuta* no ancoradouro de Monsaraz; **M** – albufeira do Alqueva, vista da vila de Monsaraz



## 4.2. Identificação dos moluscos

O esforço de captura resultou num total de 582 moluscos colhidos. Nos locais onde foi possível identificar a presença de moluscos, exemplares do género *Physa* (Mollusca: Pulmonata) foram os mais observados, assim como, alguns exemplares do género *Planorbarius* que apenas foram colhidos em Juromenha (L). Moluscos pertencentes ao género *Lymnaea* foram encontrados no ancoradouro de Monsaraz (A), no ponto 2 do Moinho do Gato (B) e no ponto 1 do parque de merendas do Campinho. Do total de moluscos colhidos, 570 pertenciam ao género *Physa*, seis ao género *Planorbarius* e seis ao género *Lymnaea*.

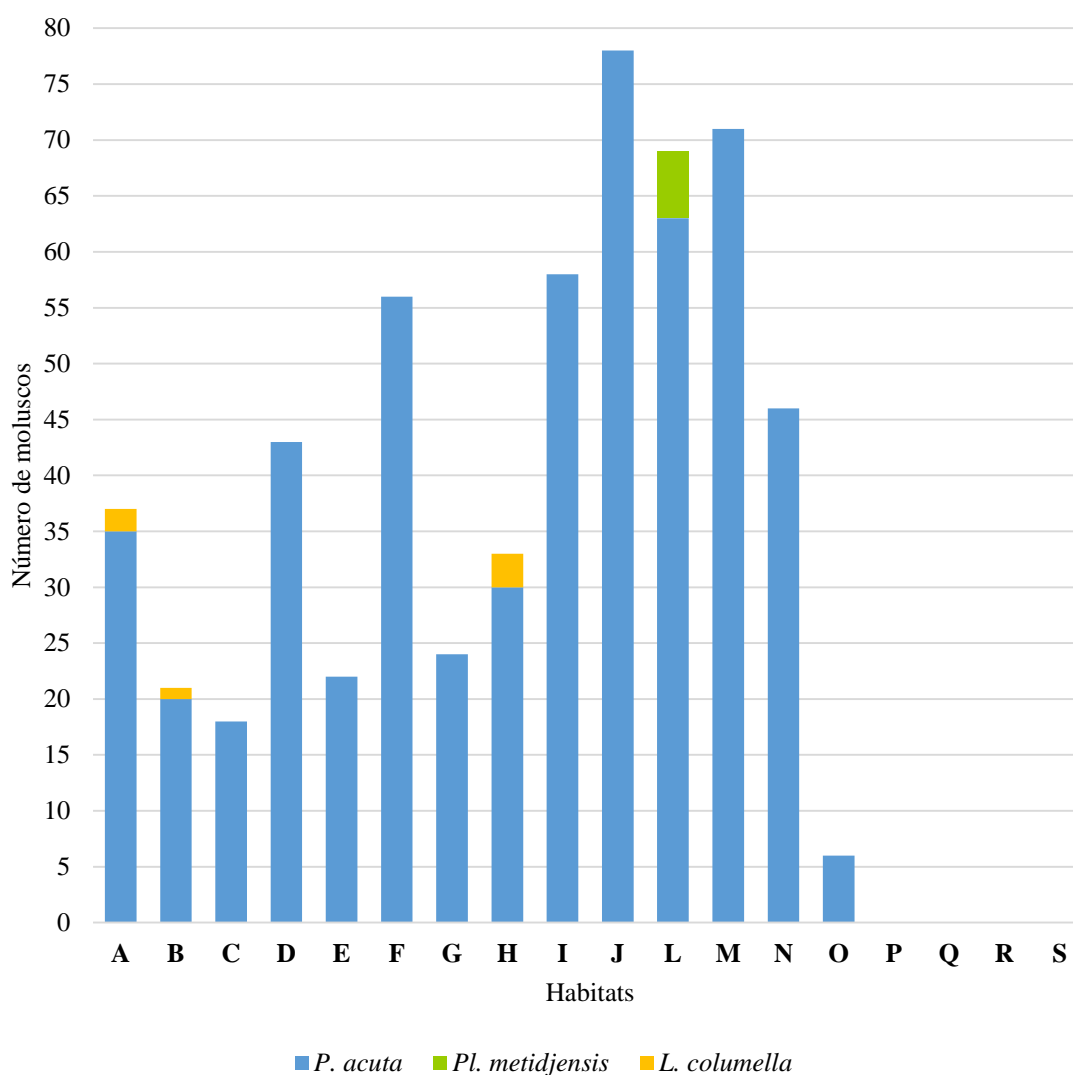
Através das características morfológicas apresentadas e com recurso à descrição efetuada por Malek & Cheng (1974), e Paraense & Pointier (2003), foi possível observar que os moluscos do género *Physa* pertenciam à espécie *Physa acuta* (Draparnaud, 1805), tendo como sinónimo o nome “*Physella acuta*” (Seeland *et al.*, 2013). Os moluscos do género *Planorbarius* pertenciam à espécie *Planorbarius metidjensis* (Forbes 1838) e os moluscos do género *Lymnaea* pertenciam à espécie *Lymnaea columella* (Say 1817).

O ponto 2 do Parque de merendas do Campinho (J) e o ancoradouro de Cheles (M) foram os locais que apresentaram maior número de colheitas, com 78 (13,4%) e 71 (12,3%), respetivamente. Por outro lado, debaixo da ponte da Amieira (O) e a albufeira de Mourão (C) foram os habitats onde se verificou o menor número de moluscos colhidos, com seis ( $n = 6$ ) (1,03%) e oito ( $n = 8$ ) (1,4%), respetivamente. Na **Tabela 5** e na **Figura 16** estão descritos os totais de moluscos colhidos por local e por espécie.

Para os 18 habitats em estudo, a média de moluscos colhidos foi de  $42 \pm 20,64$ , com uma variância de 498,11 (**Tabela 6**).

**Tabela 5** – Totais de moluscos colhidos por género e habitat

	Habitat	<i>P. acuta</i>	<i>Pl. metidjensis</i>	<i>L. columella</i>	Total moluscos
<b>A</b>	Ancoradouro de Monsaraz	35	0	2	37
<b>B</b>	Moinho do Gato 2	20	0	1	21
<b>C</b>	Albufeira de Mourão	18	0	0	18
<b>D</b>	Ribeira do Zebro	43	0	0	43
<b>E</b>	Estrela	22	0	0	22
<b>F</b>	Pq. de Merendas da Estrela	56	0	0	56
<b>G</b>	Estrada para a Granja	24	0	0	24
<b>H</b>	Pq. de Merendas do Campinho 1	30	0	3	33
<b>I</b>	Ancoradouro Amieira	58	0	0	58
<b>J</b>	Pq. de Merendas do Campinho 2	78	0	0	78
<b>L</b>	Juromenha	63	6	0	69
<b>M</b>	Ancoradouro de Cheles	71	0	0	71
<b>N</b>	Amieira (lado direito da estrada)	46	0	0	46
<b>O</b>	Amieira (debaixo da ponte)	6	0	0	6
<b>P</b>	Moinho do Gato 1	0	0	0	0
<b>Q</b>	Mourão (debaixo da ponte)	0	0	0	0
<b>R</b>	Estrada para Mourão	0	0	0	0
<b>S</b>	Antiga ponte de Mourão	0	0	0	0
	<b>TOTAL</b>	570	6	6	582



**Figura 16** – Totais de moluscos por género capturados nos diferentes locais

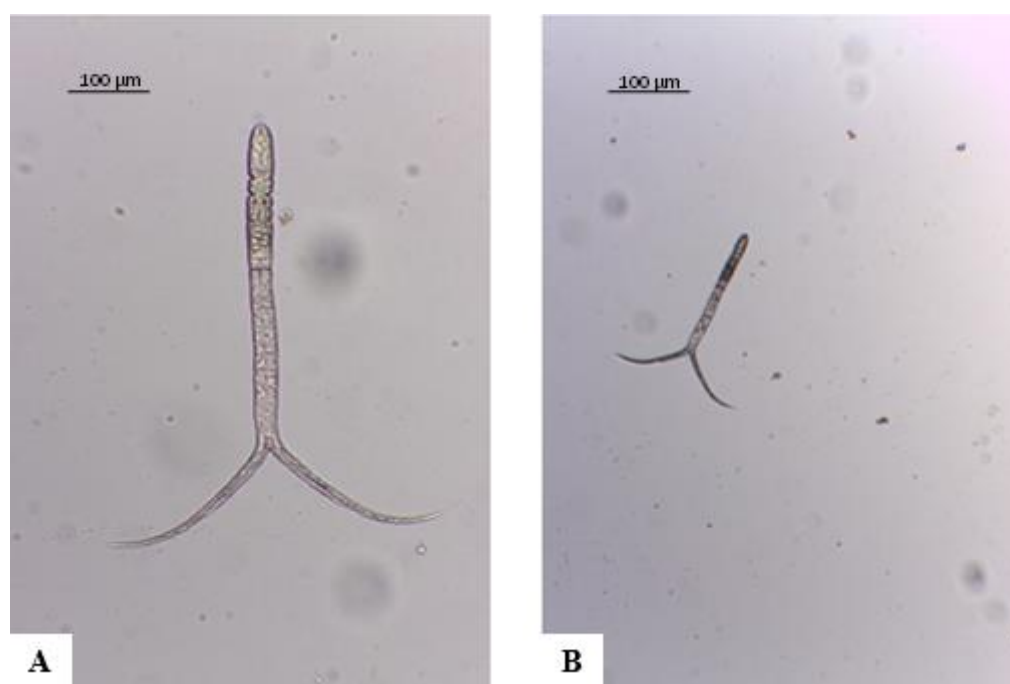
A – Ancoradouro de Monsaraz; B – Moinho do Gato 2; C – Albufeira de Mourão; D – Ribeira de Zebro; E – Estrela; F – Pq. de merendas da Estrela; G – Estrada da Granja; H – Pq. de Merendas de Campinho; I – Ancoradouro da Amieira; J – Pq. de Merendas de Campinho 2; L – Juromenha; M – Ancoradouros de Cheles; N – Amieira (lado dto estrada); O – Amieira (debaixo da ponte); P – Moinho do Gato 1; Q – Mourão (debaixo da ponte); R – Estrada para Mourão; S – Antiga ponte de Mourão.

**Tabela 6** – Medidas de dispersão do número de moluscos

Máx	Mín	Média	Mediana	Des Padrão	Variância
78	6	42	40	20,64	498,11

### 4.3. Pesquisa e identificação de cercárias

A pesquisa de cercárias efetuada em todos os moluscos colhidos foi feita de acordo com o descrito no capítulo anterior. Assim, dos moluscos expostos à luz, apenas os que foram colhidos no ancoradouro de Monsaraz (A) e mais concretamente, os moluscos da espécie *Physa acuta*, eliminaram cercárias (**Figura 17**). Com base nas suas características e de acordo com Fransdsen & Christensen (1984) as cercárias foram classificadas como sendo do tipo *Furcocercus cercaria* ( $\approx$  família Strigeidae) descritas como potenciais responsáveis pela ocorrência de dermatites cercarianas.



**Figura 17** – Cercárias obtidas depois da exposição à luz dos moluscos capturados no ancoradouro de Monsaraz (A); **A; B** – (Conchinha, 2015 - IHMT – UEI PM/HMM)

#### 4.4. Características morfométricas das conchas e a variabilidade das populações

Para o cálculo da densidade populacional foi utilizado o número médio de moluscos colhidos durante 15 minutos (Azevedo *et al.*, 1961). No total foram medidas 463 moluscos pertencentes à espécie *Physa acuta*. As conchas dos exemplares estudados (**Figura 13** apresentada no capítulo anterior) apresentaram uma relação entre a altura total e a largura total (**At/Lt**) de  $1,66 \pm 0,18$  e uma variância de 0,033 (**Tabela 7**). A altura total (**At**) apresenta um valor médio de  $5,60 \text{ mm} \pm 1,10 \text{ mm}$  e a largura total (**Lt**) um valor médio de  $3,40 \text{ mm} \pm 0,60 \text{ mm}$ , enquanto a largura e a altura da abertura (**La** e **Aa**) apresentaram um valor médio de  $1,50 \text{ mm} \pm 0,40 \text{ mm}$  e  $3,50 \text{ mm} \pm 0,70 \text{ mm}$ , respetivamente. A relação entre as medidas globais médias dos parâmetros estudados é apresentada na **Tabela 7**.

O ancoradouro de Cheles (M) foi o habitat em que as conchas apresentaram em média maiores dimensões, com uma altura total de 12 mm, a largura total com 8 mm, e a altura da abertura e a largura da abertura com 9 mm e 4 mm, respetivamente. Por outro lado o ancoradouro da Amieira (I) foi o que apresentou em média características morfométricas mais pequenas (**Tabela 7**).

Na **Figura 18** encontra-se a apresentação gráfica das médias das dimensões dos moluscos estudados.

**Tabela 7** – Características morfométricas da concha de *Physa acuta* nos habitats em estudo

Habitat		Máx	Min	Média	Dp	V
A	Ancoradouro de Monsaraz	At	10,00	6,00	8,09	0,92
		Lt	6,00	4,00	4,94	0,54
		Aa	8,00	4,00	5,37	1,06
		La	4,00	2,00	2,71	0,57
		At/Lt	2,00	1,33	1,64	0,15
		Aa/La	4,00	1,33	2,03	0,52
B	Moinho Gato 2	At	9,00	4,00	7,00	1,45
		Lt	6,00	3,00	4,40	0,99
		Aa	6,00	2,00	4,55	1,10
		La	3,00	1,00	2,05	0,76
		At/Lt	2,00	1,33	1,61	0,23
		Aa/La	4,00	1,00	2,45	0,84
C	Albufeira de Mourão	At	11,00	6,00	8,28	1,27
		Lt	7,00	3,00	4,94	0,87
		Aa	8,00	4,00	5,44	1,15
		La	3,00	1,00	2,44	0,62
		At/Lt	2,00	1,50	1,69	0,13
		Aa/La	4,00	1,67	2,34	0,59
D	Ribeiro do Zebro	At	12,00	7,00	9,34	1,11
		Lt	7,00	3,00	5,24	0,86
		Aa	9,00	4,00	5,44	1,07
		La	4,00	1,00	2,61	0,67
		At/Lt	2,33	1,50	1,80	0,17
		Aa/La	4,00	1,33	2,18	0,56
E	Estrela	At	9,00	5,00	7,00	1,11
		Lt	5,00	3,00	4,27	0,70
		Aa	6,00	2,00	4,36	1,05
		La	4,00	1,00	2,14	0,64
		At/Lt	2,00	1,40	1,65	0,20
		Aa/La	4,00	2,50	2,12	0,58

Aa – altura total (mm); Lt – largura total (mm); Aa – altura da abertura (mm); La – largura da abertura (mm);

At/Lt – relação entre a altura total e a largura total; Aa/La – relação entre a altura da abertura e a largura da abertura.

Dp - Desvio padrão; V - Variância

**Tabela 7 (cont.)** – Características morfométricas da concha de *Physa acuta* nos habitats em estudo

Habitat		Máx	Min	Média	Dp	V
F	Pq. Merendas da Estrela	At	10,00	7,00	8,55	0,83
		Lt	6,00	4,00	5,31	0,54
		Aa	7,00	4,00	5,31	0,66
		La	4,00	2,00	2,83	0,54
		At/Lt	1,86	1,33	1,62	0,15
		Aa/La	3,00	1,25	1,95	0,50
G	Estrada para a Granja	At	10,00	6,00	8,34	0,97
		Lt	6,00	4,00	5,03	0,62
		Aa	6,00	3,00	4,94	0,84
		La	4,00	1,00	2,43	0,65
		At/Lt	2,00	1,17	1,67	0,18
		Aa/La	3,00	1,25	2,12	0,47
H	Pq. Merendas do Campinho 1	At	9,00	5,00	7,32	1,20
		Lt	5,00	3,00	4,26	0,73
		Aa	6,00	3,00	4,53	0,84
		La	3,00	1,00	2,11	0,66
		At/Lt	2,00	1,25	1,73	0,20
		Aa/La	4,00	1,33	2,30	0,63
I	Ancoradouro da Amieira	At	8,00	4,00	5,60	0,90
		Lt	5,00	2,00	3,40	0,62
		Aa	5,00	2,00	3,53	0,67
		La	3,00	0,50	1,45	0,61
		At/Lt	2,00	1,25	1,67	0,20
		Aa/La	4,00	1,50	2,69	0,74
J	Pq. Merendas do Campinho 2	At	9,00	6,00	7,03	0,68
		Lt	6,00	3,00	4,39	0,57
		Aa	6,00	3,00	4,67	0,56
		La	3,00	1,00	2,26	0,50
		At/Lt	2,00	1,33	1,61	0,17
		Aa/La	5,00	1,67	2,15	0,49

Aa – altura total (mm); Lt – largura total (mm); Aa – altura da abertura (mm); La – largura da abertura (mm);

At/Lt – relação entre a altura total e a largura total; Aa/La – relação entre a altura da abertura e a largura da abertura.

Dp - Desvio padrão; V - Variância

**Tabela 7 (cont.)** – Características morfométricas da concha de *Physa acuta* nos habitats em estudo

Habitat		Máx	Min	Média	Dp	V	
J	Pq. Merendas do Campinho 2	At	9,00	6,00	7,03	0,68	0,46
		Lt	6,00	3,00	4,39	0,57	0,33
		Aa	6,00	3,00	4,67	0,56	0,31
		La	3,00	1,00	2,26	0,50	0,25
		At/Lt	2,00	1,33	1,61	0,17	0,29
		Aa/La	5,00	1,67	2,15	0,49	0,24
L	Juromenha	At	9,00	5,00	6,87	1,14	1,31
		Lt	6,00	3,00	4,23	0,75	0,56
		Aa	6,00	3,00	4,25	0,94	0,88
		La	4,00	1,00	2,25	0,59	0,34
		At/Lt	2,00	1,33	1,64	0,20	0,04
		Aa/La	3,00	1,33	1,96	0,48	0,23
M	Ancoradouro de Cheles	At	12,00	5,00	9,32	1,75	3,08
		Lt	8,00	4,00	5,59	1,75	0,87
		Aa	9,00	3,00	6,10	0,93	1,66
		La	4,00	2,00	2,96	1,29	0,44
		At/Lt	2,00	1,25	1,66	1,15	0,02
		Aa/La	3,00	1,25	2,09	0,35	0,12
N	Amieira (Lado Dto Estrada)	At	8,00	6,00	7,00	0,55	1,00
		Lt	5,00	4,00	4,20	0,45	0,20
		Aa	5,00	4,00	4,40	0,55	0,30
		La	3,00	2,00	2,40	0,55	0,30
		At/Lt	2,00	1,50	1,67	0,21	0,05
		Aa/La	2,00	1,67	1,88	0,19	0,03
O	Amieira (Debaixo Ponte)	At	8,00	6,00	7,00	1,41	2,00
		Lt	5,00	4,00	4,50	0,71	0,50
		Aa	6,00	4,00	5,00	1,41	2,00
		La	3,00	2,00	2,50	0,71	0,50
		At/Lt	1,60	1,50	1,55	0,07	0,01
		Aa/La			*		
TOTAL		At	9,30	5,60	7,62	1,05	1,11
		Lt	5,60	3,40	4,61	0,57	0,32
		Aa	6,10	3,50	4,84	0,65	0,43
		La	3,00	1,50	2,36	0,37	0,14
		At/Lt	2,33	1,17	1,66	0,18	1,66
		Aa/La	5,00	1,00	2,17	0,57	0,32

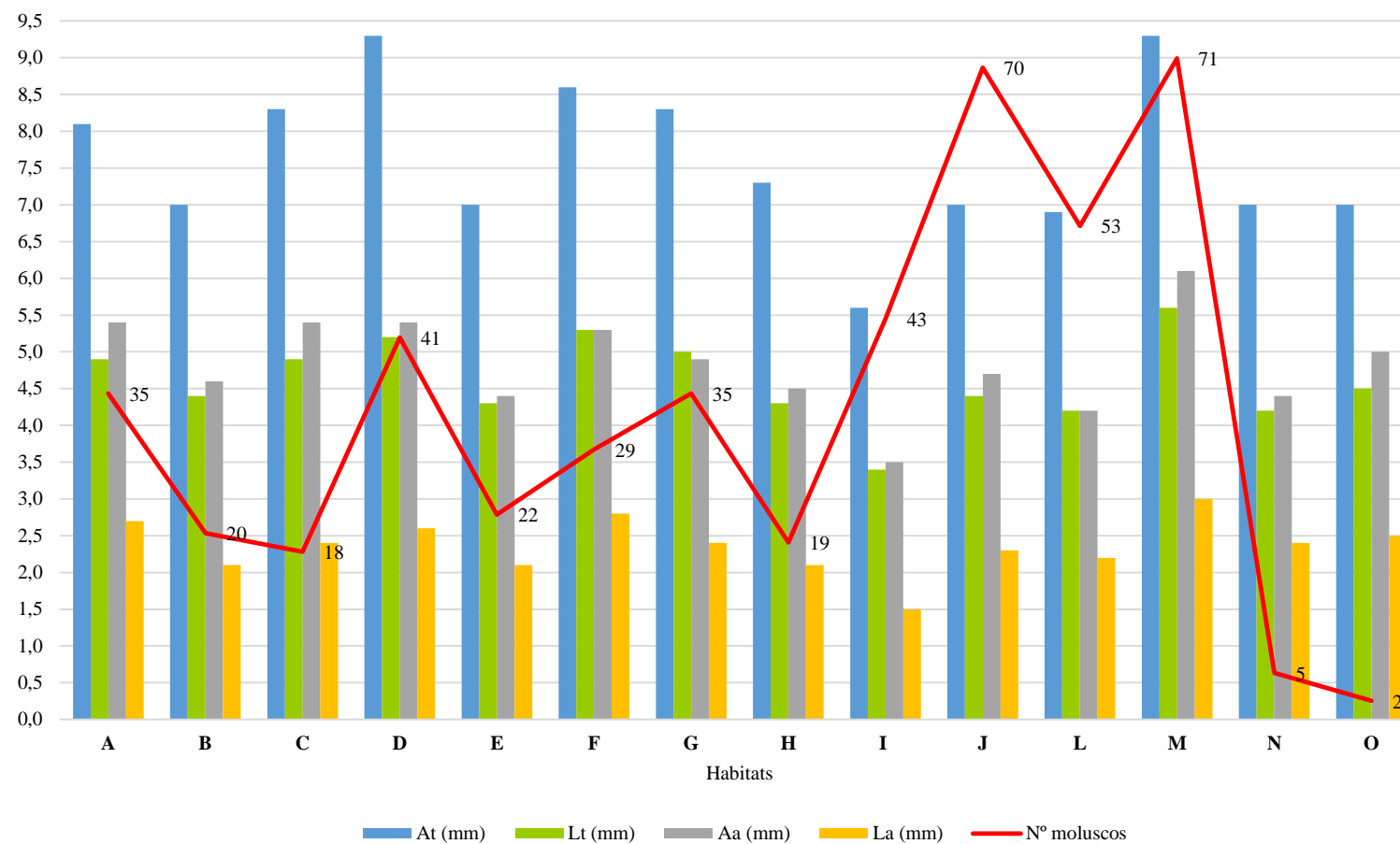
\* – O habitat não foi incluído por apresentar valores constantes para **At/Lt** e **Aa/La**

**Aa** – altura total (mm); **Lt** – largura total (mm); **Aa** – altura da abertura (mm); **La** – largura da abertura (mm);

**At/Lt** – relação entre a altura total e a largura total; **Aa/La** – relação entre a altura da abertura e a largura da abertura.

**Dp** - Desvio padrão; **V** - Variância





**Figura 18** – Relação entre as medidas das conchas com o número de moluscos capturados

A – Ancoradouro de Monsaraz; B – Moinho do Gato 2; C – Albufeira de Mourão; D – Ribeira de Zebro; E – Estrela; F – Pq. de merendas da Estrela; G – Estrada da Granja; H – Pq. de Merendas de Campinho; I – Ancoradouro da Amieira; J – Pq. de Merendas de Campinho 2; L – Juromenha; M – Ancoradouros de Cheles; N – Amieira (lado dto estrada); O – Amieira (debaixo da ponte).

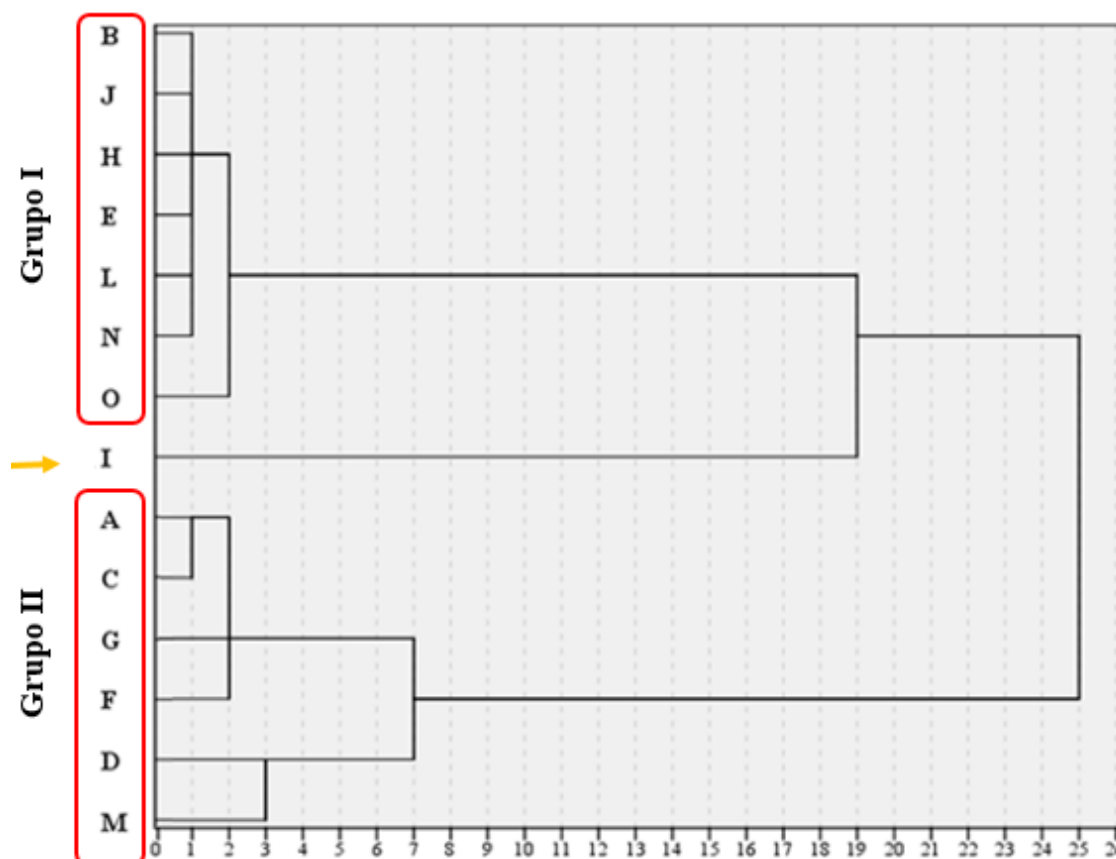
No estudo da variabilidade da concha dos moluscos colhidos, os habitats estudados apresentaram diferenças inter-populacionais, as quais incidiram sobre a altura total (**At**), largura total (**Lt**), altura da abertura (**Aa**) e largura da abertura (**La**) (**Tabela 7**). O teste de Kruskal Wallis permitiu evidenciar diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,01$ ), entre as características morfométricas dos moluscos colhidos.

A **Tabela 8** e a **Figura 19** mostram-nos as distâncias entre os habitats, reescaladas e relativas, indicando os graus de similaridade na formação de agrupamentos. Quanto menor a distância euclidiana, menor é a diferença (ou maior é a semelhanças ou proximidade) entre os habitats. Assim, o ancoradouro da Amieira (I) foi o habitat que apresentou a diferença mais considerável em relação aos restantes. Os habitats ancoradouro da Amieira (I) e a Ribeira do Zebro (D) são os que apresentam maiores distâncias (21,75) relativamente aos restantes habitats, seguido pelo parque de merendas da Estrela (F) (17,54).

**Tabela 8** – Matriz de proximidade utilizando a distância euclidiana para os habitats em estudo

<b>Distância Euclidiana Quadrática</b>													
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>J</b>	<b>L</b>	<b>M</b>	<b>N</b>
<b>B</b>	2,46												
<b>C</b>	0,13	2,67											
<b>D</b>	1,54	6,82	1,13										
<b>E</b>	2,93	0,05	3,14	7,35									
<b>F</b>	0,43	4,35	0,42	0,55	4,86								
<b>G</b>	0,39	2,23	0,26	1,33	2,52	0,50							
<b>H</b>	2,17	0,11	2,26	5,87	0,10	3,82	1,74						
<b>I</b>	13,55	4,53	13,96	21,75	3,94	17,54	12,62	5,06					
<b>J</b>	2,11	0,05	2,44	6,51	0,14	3,98	2,10	0,18	5,04				
<b>L</b>	3,62	0,22	3,93	8,36	0,07	5,67	3,13	0,27	3,31	0,31			
<b>M</b>	2,51	9,79	2,34	0,81	10,68	1,26	3,16	9,06	27,54	9,18	11,97		
<b>N</b>	2,79	0,17	3,18	7,33	0,10	4,74	2,58	0,20	4,22	0,14	0,09	10,50	
<b>O</b>	1,57	0,33	2,02	5,95	0,56	3,38	1,96	0,54	6,42	0,14	0,83	7,96	0,46

**A** – Ancoradouro de Monsaraz; **B** – Moinho do Gato 2; **C** – Albufeira de Mourão; **D** – Ribeira de Zebro; **E** – Estrela; **F** – Pq. de merendas da Estrela; **G** – Estrada da Granja; **H** – Pq. de Merendas de Campinho; **I** – Ancoradouro da Amieira; **J** – Pq. de Merendas de Campinho 2; **L** – Juromenha; **M** – Ancoradouros de Cheles; **N** – Amieira (lado dto estrada); **O** – Amieira (debaixo da ponte).



**Figura 19** – Dendrograma das ligações médias entre os grupos estudados

A – Ancoradouro de Monsaraz; B – Moinho do Gato 2; C – Albufeira de Mourão; D – Ribeira de Zebro; E – Estrela; F – Pq. de merendas da Estrela; G – Estrada da Granja; H – Pq. de Merendas de Campinho; I – Ancoradouro da Amieira; J – Pq. de Merendas de Campinho 2; L – Juromenha; M – Ancoradouros de Cheles; N – Amieira (lado dto estrada); O – Amieira (debaixo da ponte).

Na **Figura 19**, o dendrograma obtido pelo Método da Distância Média entre grupos com recurso à distância Euclidiana baseado na variação dos parâmetros morfométricos dos moluscos, permitiu agrupar os habitats e obter assim dois grupos (clusters) distintos. O primeiro grupo formado por: local 2 do moinho do Gato (B), locais 1 e 2 do parque de merendas do Campinho (H e J), Estrela (E), Juromenha (L), lado direito da estrada da Amieira (N) e debaixo da ponte da Amieira (O).

O segundo grupo é formado pelos seguintes habitats: ancoradouro de Monsaraz (A), albufeira de Mourão (C), estrada para a Granja (G), parque de merendas da Estrela (F), ribeira do Zebro (D) e ancoradouro de Cheles (M). Os habitats que limitam os grupos apresentam estreita similaridade com o grupo vizinho. O habitat O (debaixo da ponte da Amieira) limita os restantes habitats que formam o **Grupo I**, cuja proximidade é maior, relativamente aos habitats que compõem o **Grupo II**. O habitat I (ancoradouro da

Amieira) apresenta maior similaridade com os restantes habitats do **Grupo I** do que com os habitats do **Grupo II**, apesar de formar um subgrupo isolado.

Os habitats moinho do Gato 2 (B), parque de merendas Campinho 2 (J), parque de merendas Campinho 1 (H), Estrela, Juromenha (L) e Amieira (debaixo da ponte) (N) agrupados no **Grupo I**, apresentaram níveis de similaridade bastante próximos entre si, variando entre os 0,05 e 0,22.

No **Grupo II**, os habitats que o constituem formam dois subgrupos distintos. Um subgrupo formado pelos habitats ancoradouro de Monsaraz (A), albufeira de Mourão (C), estrada para a Granja (G) e parque de merendas da Estrela (F) e um outro, pelos habitats ribeira do Zebro (D) e ancoradouro de Cheles (M). O parque de merendas da Estrela (F) apresenta uma maior similaridade com os habitats ancoradouro de Monsaraz (A) (0,43), albufeira de Mourão (C) (0,42) e estrada para a Granja (G) (0,5).

## 4.5. Análise das variáveis

### 4.5.1. Variáveis Ambientais – Temperatura, pH, Condutividade elétrica e Oxigénio dissolvido

Os valores das variáveis temperatura, pH, condutividade elétrica e oxigénio dissolvido, registadas nos 18 habitats estão descritos na **Tabela 9**.

Elaborada uma primeira análise estatística às variáveis foi possível determinar os valores máximos e mínimos, bem como as médias, desvios padrão e variâncias. Os resultados encontram-se apresentados na **Tabela 10**.

A temperatura apresentou valores máximos de 31,6°C que correspondeu ao habitat estrada para Mourão (R) e valores mínimos de 15,8°C no habitat debaixo da ponte da Amieira (O). A média da temperatura da água para os 18 habitats foi 23,7°C  $\pm$  4,8 com uma variância de 23,2.

O pH variou entre os valores máximos de 8,3 em Amieira (N) e valores mínimos de 6,7 no local 2 do parque de merendas do Campinho (J). O pH médio foi de 7,5  $\pm$  0,4, com uma variância de 0,2. Para a condutividade elétrica verificou-se uma variação mais significativa, cujo valor máximo foi de 526,0  $\mu$ S/cm na ribeira do Zebro (D) e o mínimo de 69,2  $\mu$ S/cm, na estrada para a Granja (G). O valor médio para a condutividade foi de 200,2  $\mu$ S/cm  $\pm$  100,4 e uma variância de 10071,7.

Por último, o oxigénio dissolvido na água apresentou valores muito semelhantes aos da temperatura da água, com valores máximos de 31,2 mg/L para a estrada de Mourão (R) e valores mínimos de 16,4 mg/L debaixo da ponte da Amieira (O). A média foi 23,6 mg/L  $\pm$  4,8 e uma variância de 23,3.

Será de reter a grande aproximação de valores entre a temperatura e o oxigénio dissolvido e também a baixa variação nos valores de pH que em alguns locais distam apenas de um valor decimal.

**Tabela 9** – Valores obtidos para as variáveis temperatura, pH, condutividade elétrica e O<sub>2</sub> nos habitats em estudo

	Habitat	T (°C)	pH	Ce (µS/cm)	O <sub>2</sub> (mg/L)	Total moluscos
<b>A</b>	Ancoradouro de Monsaraz	26,5	7,7	210,0	26,1	37
<b>B</b>	Moinho do Gato 2	28,5	8,2	106,0	29,9	21
<b>C</b>	Albufeira de Mourão	27,9	7,9	220,0	27,4	18
<b>D</b>	Ribeira do Zebro	23,8	6,8	526,0	23,7	43
<b>E</b>	Estrela	24,3	7,8	194,0	24,6	22
<b>F</b>	Pq. de Merendas da Estrela	24,8	7,2	200,0	23,7	56
<b>G</b>	Estrada para a Granja	23,1	7,2	69,2	23,6	24
<b>H</b>	Pq. de Merendas do Campinho 1	22,8	7,5	203,0	22,8	33
<b>I</b>	Ancoradouro da Amieira	21,5	7,8	199,0	21,5	58
<b>J</b>	Pq. de Merendas do Campinho 2	17,9	6,7	114,0	17,4	78
<b>L</b>	Juromenha	17,2	7,1	311,0	16,4	69
<b>M</b>	Ancoradouro de Cheles	18,9	7,1	253,0	18,6	71
<b>N</b>	Amieira (lado dto da estrada)	16,7	8,3	197,0	17,4	46
<b>O</b>	Amieira (debaixo da ponte)	15,8	7,7	200,0	16,4	6
<b>P</b>	Moinho do Gato 1	26,3	7,9	209,0	25,6	0
<b>Q</b>	Mourão (debaixo da ponte)	28,9	8,0	112,0	29,4	0
<b>R</b>	Estrada para Mourão	31,6	7,3	118,0	31,2	0
<b>S</b>	Antiga ponte de Mourão	29,3	7,5	163,0	28,9	0
<b>TOTAL</b>						582

**Tabela 10** – Medidas de dispersão da temperatura, pH, condutividade elétrica e O<sub>2</sub>

	Mín	Máx	Média	Dp	V
<b>T</b>	15,8	31,6	23,7	4,8	23,2
<b>pH</b>	6,7	8,3	7,5	0,4	0,2
<b>Ce</b>	69,2	526,0	200,2	100,4	10071,7
<b>O<sub>2</sub></b>	16,4	31,2	23,6	4,8	23,3

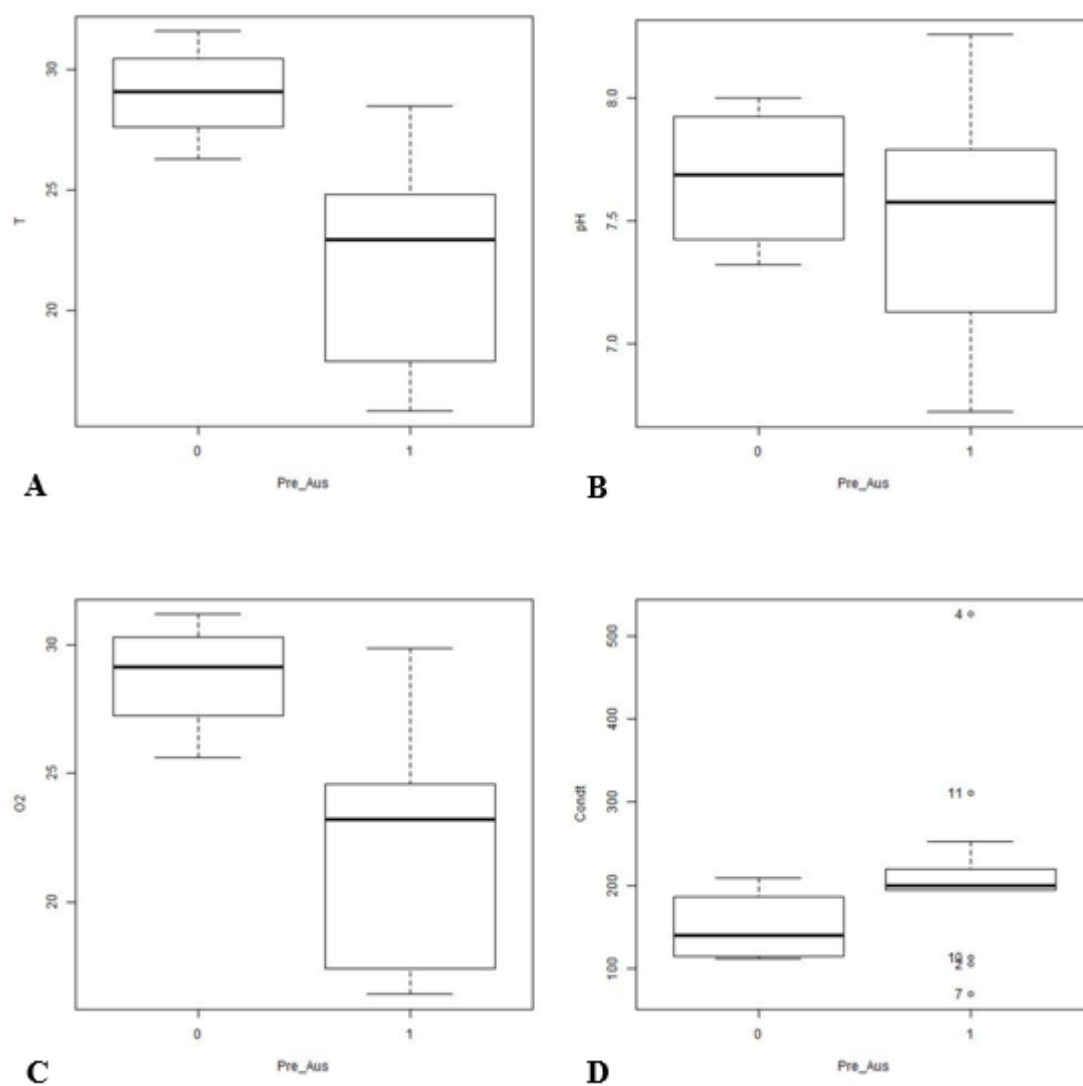
**Dp** - Desvio padrão; **V** - Variância

Com vista a compreender a relevância destas variáveis na presença e ausência de moluscos colhidos nos habitats em análise, e a aplicabilidade da análise estatística (descrita no capítulo anterior), os resultados obtidos estão descritos na **Figura 20**.

Assim, podemos observar que a presença de moluscos ocorre com uma temperatura mediana de 24° C, enquanto a ausência de moluscos pode ser observada a temperaturas cuja mediana é mais elevada ( $\approx 29^{\circ}\text{C}$ ). Relativamente ao pH a presença e ausência de moluscos ocorreu com valores medianos de 7,6 e 7,7, respetivamente.

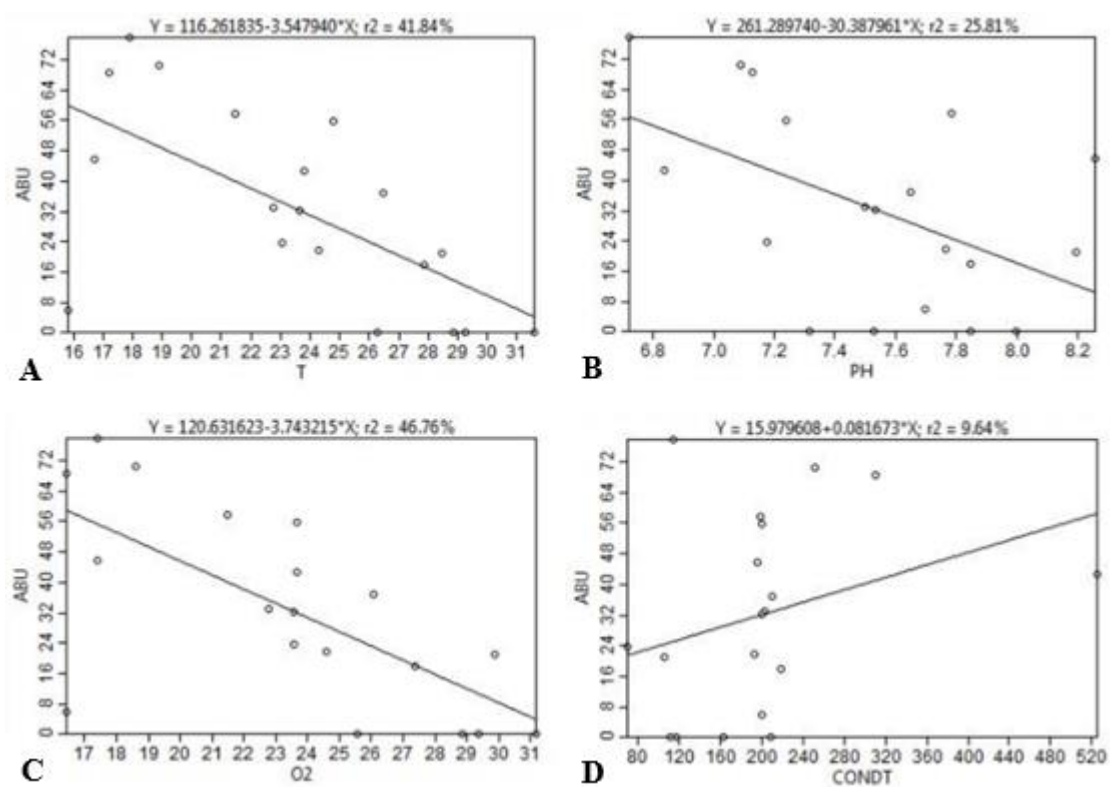
Em relação ao  $\text{O}_2$ , podemos observar valores medianos de 24 mg/L para a presença de moluscos e 29 mg/L para a ausência. Por último, a Ce apresenta valores medianos para a presença de moluscos de aproximadamente 200  $\mu\text{S}/\text{cm}$  e valores medianos para a ausência de moluscos de aproximadamente 140  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Através da regressão linear foi possível observar a relação proporcional entre as variáveis e o número de moluscos colhidos, cujos resultados são apresentados na **Figura 21**. É possível verificar que a temperatura segue uma relação inversamente proporcional ao número de moluscos, assim como, o  $\text{O}_2$  e o pH. A Ce no entanto é a variável que se comporta de forma diretamente proporcional ao número de moluscos, ou seja, um aumento da condutividade implica um aumento do número de moluscos.



**Figura 20** – Boxplots das diferentes variáveis com referência à presença (1) e ausência (0) de moluscos (Pereira, 2015); **A** – Temperatura; **B** – pH; **C** – O<sub>2</sub>; **D** – Condutividade elétrica





**Figura 21** – Retas de regressão linear com base nas variáveis estudadas e no número de moluscos capturados em cada local (ABU) (Pereira, 2015); **A** – Temperatura; **B** – pH; **C** – O<sub>2</sub>; **D** – Condutividade elétrica

De forma a estabelecer a correlação entre estas variáveis foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Spearman ( $\rho$ ) em que a significância ( $P < 0,01$ ) é estimada por valores de  $\rho$  próximos de 1, cujos resultados são apresentados na **Tabela 11**.

Dos valores apresentados, apenas a relação entre a temperatura e o oxigénio dissolvido na água, assume valores de 0,98, bastante próximo de 1, sendo estatisticamente significativos.

**Tabela 11** – Aplicação do coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ )

		pH	Ce	O <sub>2</sub>
T	$\rho$	0,27	-0,29	0,98
	$P$	0,29	0,25	0,00
pH	$\rho$		-0,26	0,36
	$P$		0,29	0,14
Ce	$\rho$			-0,33
	$P$			0,19

Para obter a relação entre o número de moluscos e as variáveis ambientais foi também aplicado o mesmo coeficiente de correlação. A temperatura (T) apresenta uma relação negativa com o número de moluscos ( $\rho = -0,367$ ) e é estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ). O pH e a oxigenação da água (O<sub>2</sub>) também apresentam relações negativas ( $\rho = -0,413$  e  $\rho = -0,380$ , respetivamente), sendo ambos estatisticamente significativos ( $P < 0,01$ ). Por último, a condutividade elétrica (Ce) apresenta uma relação positiva ( $\rho = 0,112$ ), também estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

#### 4.5.2. Características biológicas dos habitats – Vegetação, Substrato e Exposição Solar

No âmbito da colheita dos moluscos foram registados também o tipo de vegetação na água, de substrato existente e de exposição solar. Os registos encontram-se na **Tabela 12**. De forma a quantificar o total de habitats que apresentavam determinada vegetação e substrato e a sua relação com o número de moluscos foi feita uma análise gráfica apresentada na **Figura 22** e na **Figura 23**.

Foram registados dois habitats com vegetação emergente, sendo eles o ancoradouro de Monsaraz (A) e o ancoradouro da Amieira (I) com um total de 95 moluscos colhidos. A vegetação imersa foi observada na maioria dos habitats, mais especificamente em 12, sendo eles: os locais 1 e 2 do Moinho do Gato (P e B), a ribeira do Zebro (D), a Estrela (E), o parque de merendas da Estrela (F), a estrada para a Granja (G), os locais 1 e 2 do parque de merendas do Campinho (H e J), a Juromenha (L), o ancoradouro de Cheles (M), o lado direito da estrada da Amieira (N) e debaixo da ponte da Amieira (O); nestes habitats foram capturados um total de 469 moluscos. A vegetação flutuante (lentilhas de água - *Lemna minor*) foi observada em 3 habitats, na albufeira de Mourão (C), na estrada para Mourão (R) e na antiga ponte de Mourão (S), onde foram colhidos 18 moluscos. A ausência de vegetação apenas foi verificada num habitat – debaixo da ponte de Mourão (Q) – no qual não foram colhidos moluscos.

A vegetação apresenta, segundo o coeficiente de correlação de Spearman uma relação positiva ( $\rho = 0,102$ ) e estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

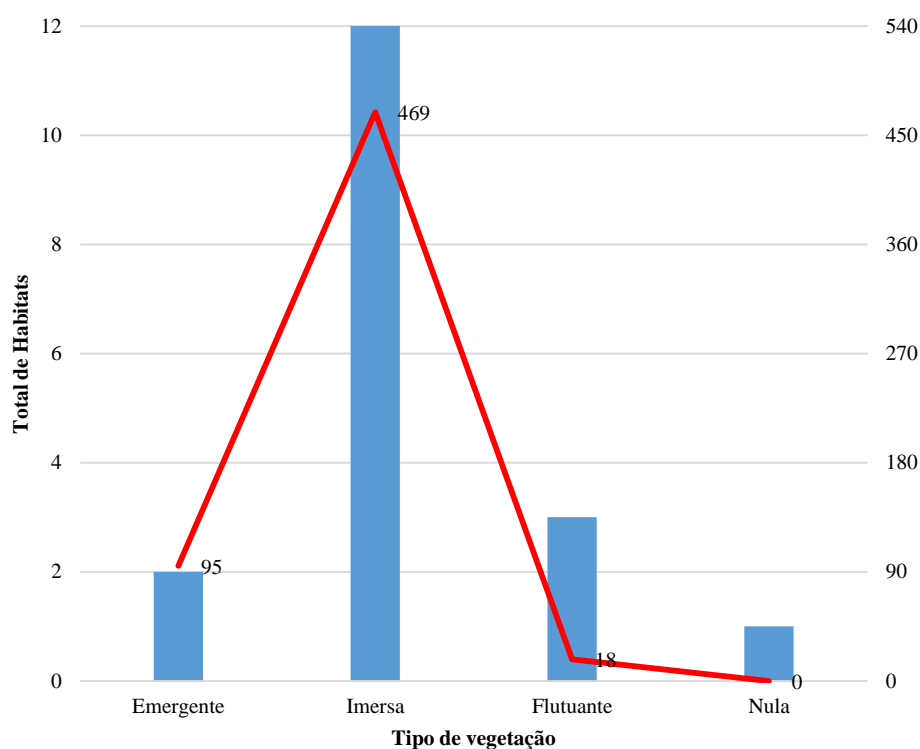
Quanto ao tipo de substrato nos habitats, estes foram classificados em solos em que a argila, areia e rochas foram predominantes. Será ainda de realçar que na totalidade dos habitats foi ainda verificada a presença de matéria em decomposição. Os solos argilosos representam um total de 11 dos 18 habitats estudados, sendo eles: o ancoradouro de Monsaraz (A), a albufeira de Mourão (C), a ribeira do Zebro (D), a estrada para a Granja (G), os locais 1 e 2 do parque de merendas do Campinho (H e J), o ancoradouro da Amieira (I), a Juromenha (L), o lado direita da estrada da Amieira (N), debaixo da ponte da Amieira (O) e o local 1 do Moinho do Gato (P); nestes habitats foram capturados um total de 412 moluscos. Os solos arenosos foram observados em 4 habitats, o local 2 do Moinho do Gato (B), debaixo da ponte de Mourão (Q), na estrada para Mourão (R) e na antiga ponte de Mourão (S), onde foram capturados 21 moluscos. Os solos rochosos observaram-se num total de 3 habitats, na Estrela (E), no parque de merendas da Estrela (F) e no ancoradouro de Cheles (M), nestes habitats foi colhido um total de 149 moluscos.

O substrato não apresentou uma significância estatística quando aplicado o coeficiente de correlação de Spearman ( $P = 0.739$ ).

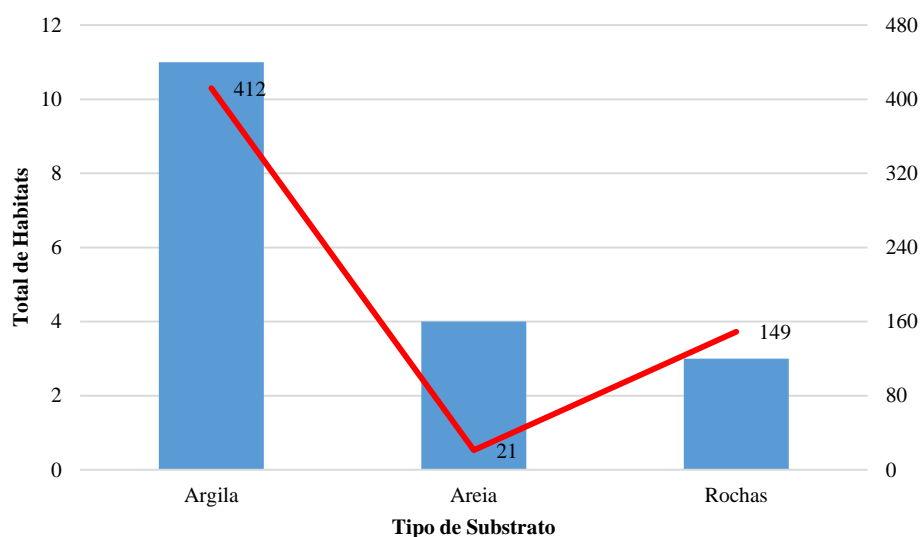
Será ainda de indicar que a exposição solar foi sempre a mesma em todos os 18 habitats, sendo uma exposição total do habitat ao sol.

**Tabela 12** – Tipo de vegetação e substratos encontrados nos habitats em estudo

	Habitat	Vegetação na água	Substrato	Total de moluscos
<b>A</b>	Ancoradouro de Monsaraz	Emergente	Argila	37
<b>B</b>	Moinho do Gato 2	Imersa	Areia	21
<b>C</b>	Albufeira de Mourão	Flutuante	Argila	18
<b>D</b>	Ribeira do Zebro	Imersa	Argila	43
<b>E</b>	Estrela	Imersa	Rochas	22
<b>F</b>	Pq. de Merendas da Estrela	Imersa	Rochas	56
<b>G</b>	Estrada para a Granja	Imersa	Argila	24
<b>H</b>	Pq. de Merendas do Campinho 1	Imersa	Argila	33
<b>I</b>	Ancoradouro da Amieira	Emergente	Argila	58
<b>J</b>	Pq. de Merendas do Campinho 2	Imersa	Argila	78
<b>L</b>	Juromenha	Imersa	Argila	69
<b>M</b>	Ancoradouro de Cheles	Imersa	Rochas	71
<b>N</b>	Amieira (lado dto da estrada)	Imersa	Argila	46
<b>O</b>	Amieira (debaixo da ponte)	Imersa	Argila	6
<b>P</b>	Moinho do Gato 1	Imersa	Argila	0
<b>Q</b>	Mourão (debaixo da ponte)	Nula	Areia	0
<b>R</b>	Estrada para Mourão	Flutuante	Areia	0
<b>S</b>	Antiga ponte de Mourão	Flutuante	Areia	0
<b>TOTAL</b>				582



**Figura 22** – Relação entre o número de habitats e as características da vegetação encontrada com o número de moluscos capturados

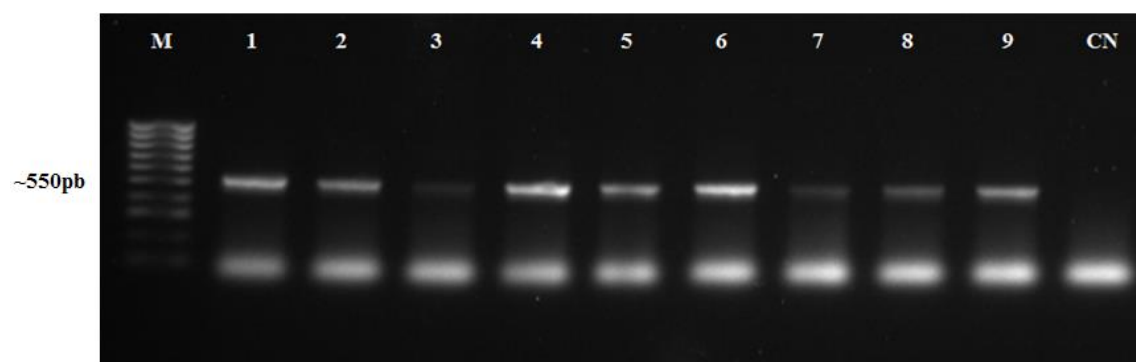


**Figura 23** – Relação entre o número de habitats e as características do substrato encontrado com o número de moluscos capturados

## 4.6. DNA Genómico dos moluscos

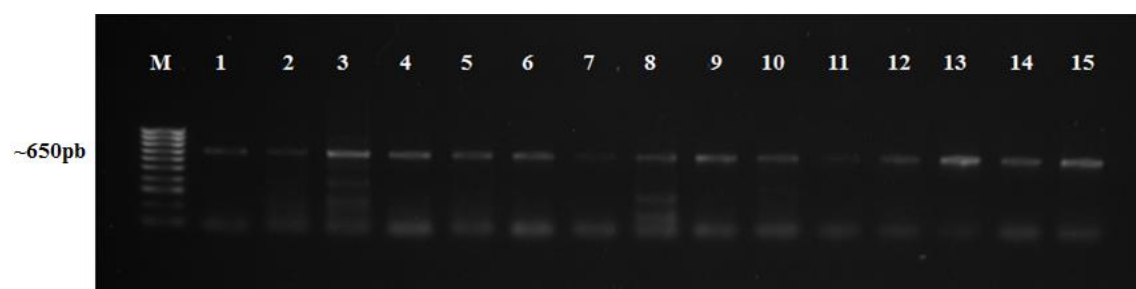
### 4.6.1. Polimorfismos dos genes CO1 e 16S

Em todos os habitats analisados, observou-se a amplificação de um fragmento com aproximadamente 550 pb e 650 pb, para o gene 16S e o gene CO1, respetivamente (Figura 24 e 25).



M – Marcador; 1 – Ribeira do Zebro (D); 2 – Juromenha (L); 3 – Pq. merendas do Campinho 1 (H); 4 – Moinho do Gato 2 (B); 5 – Acoradouro de Monsaraz (A); 6, 9 – Acoradouro da Amieira (I); 7, 8 – Estrada para a Granja (G); CN – Controlo Negativo

**Figura 24** – Amplificação de produto de PCR em gel de agarose a 1% para o gene 16S



M – Marcador; 1, 6, 7, 11 – Acoradouro de Cheles (M); 2 – Moinho do Gato 2 (B); 3, 5, 10 – Pq. merendas do Campinho 1 (H); 4, 9 – Juromenha (L); 8 – Amieira (lado direito estrada) (N); 12 – Pq. merendas do Campinho 2 (J); 13, 14 – Estrada para a Granja (G); 15 – Acoradouro da Amieira (I);

**Figura 25** – Amplificação de produto de PCR em gel de agarose a 1% para o gene CO1

#### 4.6.2. Sequenciação das amostras amplificadas

Para a sequenciação das amostras foram amplificados os genes 16S e CO1. Das amostras amplificadas foram selecionadas para sequenciar as que apresentaram a melhor resolução e que fossem representativas de cada um dos habitats em análise. Após sequenciadas as amostras e analisados os resultados obtidos, as sequencias que mostraram resultados incongruentes foram retiradas dos estudos, e as que foram incluídas, ainda que parciais, foram alinhadas manualmente, cujos resultados obtidos para os genes 16S e CO1 podem ser observados na **Figura 26** e **Figura 27**, respectivamente.

O conjunto das amostras para o gene 16S, apresentaram um baixo índice de polimorfismo com um valor para o cálculo da diversidade nucleotídica de  $\pi = 0,0164$ , enquanto a diversidade haplotípica (**Hd**) foi de  $0,933 \pm 0,122$ . O número médio de diferenças entre nucleótidos foi **K** = 6,00.

Para o gene CO1, o cálculo da diversidade nucleotídica para o conjunto das amostras foi  $\pi = 0,062$ , apresentando um índice igualmente baixo. A diversidade haplotípica foi **Hd** = 1,00 enquanto o número médio de diferenças entre nucleótidos foi **K** = 28,8.

As sequências obtidas foram alinhadas em conjunto com sequências homólogas que se encontram disponíveis na base de dados (GenBank: AY651193.1; KF412768.1) para os dois genes (16S e CO1, respectivamente). Foi selecionada a que apresentava maior homologia (99%) com as amostras por nós obtidas. Ao analisar o conjunto foram encontrados vários polimorfismos entre as nossas amostras e as que foram obtidas na base de dados, como se pode observar na **Figura 28**, para o gene 16S e na **Figura 29** para o gene CO1.

A1	ACGGCCGCAGTACCTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGCTA
A12	.....
A2	.....
A4	.....
A10	.....
A11	.....A.....
A1	TTAATTGTAGTCTAGTATGAATGAAGTAATGAATAGTTATAATAAAAA
A12	.....
A2	.....
A4	.....AA.....
A10	.....
A11	.....
A1	ATATTATTTTAATTTAATGAAC TGGT GAAAATTC CAATATATAGAAAA
A12	.....
A2	.....
A4	.....A...G.....
A10	.....
A11	.....
A1	AAGACGAGAAGACCCCTTAGAGTTTTTGAAATAAAGATTGTTTAAGACT
A12	.....
A2	.....
A4	.....A.....A...
A10	.....
A11	.....
A1	TTAATAGATCTACTCTTAAAGAAATAATACAATACACTTTTTTGTGG
A12	.....T.....
A2	.....T.....
A4	.....T.....T...CT.....C.....
A10	.....T.....
A11	.....T.....
A1	GGCGACAAGAAAGCAATATAACCTTTCTATTGACACTAAAAGTGGTAT
A12	.....
A2	.....
A4	.....T...G.....
A10	.....
A11	.....
A1	TAGATCTGACGAATTTATTATGAATGACTAACTACCTGAGGGATAAC
A12	.....
A2	.....
A4	.....TG.....
A10	.....
A11	.....
A1	AGCATAATGATTAATATTAGTTTGTGACCT
A12	.....
A2	.....
A4	.....A.....
A10	...G.....
A11	.....

**Figura 26** – Alinhamento dos nucleótidos para o gene 16S de *Physa acuta* (*Physella acuta*)

A1 – Ancoradouro Monsaraz; A2 – Moinho do Gato 2; A4 – Ribeira do Zebro; A10 – Ancoradouro Amieira; A11 – Pq. Merendas Campinho 2; A12 – Juromenha.



```

A11  -----TTGTTACAGCTCATGCTTTTGTAATGATTTTTTTT
A2   -----
A7   -----A-----
A13  -----
A12  -----
A10  -----

A11  ATAGTTATACCGATAATAATTGGAGGGTTTGGGAATTGAATAGTACCTATATTAATTGGT
A2   .....G.....
A7   .....A.....
A13  .....
A12  .....
A10  .....

A11  GCTCCCGATATAAGATTTCTCTCGAATAAATAATATAAGATTTTGACTTTTACCTCCTTCA
A2   .....
A7   .....T.....C.....
A13  .....
A12  .....
A10  .....

A11  TTTATCTTATTATTATGTAGGTCTATAGTTGAGGGTGGAGTTGGAACCTGGGTGAACTGTT
A2   .....
A7   .....A.....
A13  .....
A12  .....
A10  .....

A11  TACCCCCCCTCCCAGGATGTGTACCTCACTCC
A2   .....T..AT.....C....A.....T
A7   ..T..T..T..AT.....CC....G.....T
A13  .....T..AT.....C....G.....T
A12  .....T..AT.....C....G.....T
A10  .....C.....C.....T

```

**Figura 27** – Alinhamento dos nucleótidos para o gene CO1 de *Physa acuta* (*Physella acuta*)

A2 – Moinho do Gato 2; A7 – Estrada para a Granja; A10 – Ancoradouro Amieira; A11 – Pq. Merendas Campinho 2; A12 – Juromenha; A13 – Ancoradouro Cheles

<i>Physa acuta</i> 16S	CGGCCGCGAGTACCTTGACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTGGC
A1	.....
A12	.....
A2	.....
A4	.....
A10	.....
A11	....A.....A.....
<i>Physa acuta</i> 16S	TATTAATTGTAGTCTAGTATGAATGAAGTAATGAATAGTAGCTAT
A1	.....
A12	.....
A2	.....
A4	.....AA.....A....
A10	.....
A11	.....
<i>Physa acuta</i> 16S	AATAAAAAATATTATTTTAATTTAATGAACTGGTGAAAATACCAA
A1	.....T....
A12	.....T....
A2	.....T....
A4	.....G
A10	.....T....
A11	.....T....
<i>Physa acuta</i> 16S	TATATAGAAAAAGACGAGAAGACCCTTAGAGTTTTTGAAATAAA
A1	.....
A12	.....
A2	.....
A4	.....A.....
A10	.....
A11	.....
<i>Physa acuta</i> 16S	GATTGTTTAAGACTTTAATTTGATACTACTCTTAAAGTAATTATA
A1	.....A.....A..A...
A12	.....A.....A.....
A2	.....A.....A.....
A4	.....A.....-AT..C.....C....
A10	.....A.....A.....
A11	.....A.....A.....
<i>Physa acuta</i> 16S	CAATACACTTTTTTGTGGGGCGACAAGAAAGCAATATAACCTTT
A1	.....
A12	.....
A2	.....
A4	...C.....
A10	.....
A11	.....
<i>Physa acuta</i> 16S	CTATTGACACTAAAAGTGGTATTAGATCTGACGAATTTATTATGA
A1	.....
A12	.....
A2	.....
A4	.....T..G.....TG.....
A10	.....
A11	.....
<i>Physa acuta</i> 16S	ATGACTAAACTACCTGAGGGATAACAGCATAATGATAAATATTAG
A1	.....T.....
A12	.....T.....
A12	.....T
A2	.....T.....

**Figura 28** – Comparação das sequências obtidas com uma sequência contida no banco de dados (GenBank: AY651193.1) para o gene 16S

A1 – Ancoradouro Monsaraz; A2 – Moinho do Gato 2; A4 – Ribeira do Zebro; A10 – Ancoradouro Amieira; A11 – Pq. Merendas Campinho 2; A12 – Juromenha.

```

Physa acuta CO1    AACATTATATTTAATTTTTGGGATCTTGTTACAGCTCATGCTTTTGTAATGATTTTTTTT
A11                -----
A2                -----
A7                -----
A13                -----
A12                -----
A10                -----

Physa acuta CO1    ATAGTAATACCGATAATAATTGGAGGGTTTGGGAATTGAATAGTACCTATATTAATTGGT
A11                .....T.....
A2                .....T.G.....
A7                .....T.....A.....
A13                .....T.....
A12                .....T.....
A10                .....T.....

Physa acuta CO1    GCTCCCGATATAAGATTTCTCGAATAAATAATATAAGATTTTGACTTTTACCTCCTTCA
A11                .....
A2                .....
A7                .....T.....C.....
A13                .....
A12                .....
A10                .....

Physa acuta CO1    TTTATCTTATTATTATGTAGGTCTATAGTTGAGGGTGGAGTTTGGAACTGGGTGAACTGTT
A11                .....
A2                .....
A7                .....A.....
A13                .....
A12                .....
A10                .....

Physa acuta CO1    TACCCCCCTCTATCAGGACCTGTAGCTCACTCT
A11                .....C..CC.....TG....C.....C
A2                .....T.....A.....
A7                ..T..T.....
A13                .....T.....
A12                .....T.....
A10                .....C.CCC.....T.....C.....

```

**Figura 29** – Comparação das sequências obtidas com uma sequência contida no banco de dados (GenBank: KF412768.1) para o gene CO1

A2 – Moinho do Gato 2; A7 – Estrada para a Granja; A10 – Ancoradouro Amieira; A11 – Pq. Merendas Campinho 2; A12 – Juromenha; A13 – Ancoradouro Cheles

#### 4.7. Modelo SIG de distribuição territorial

O modelo SIG apresentava como objetivo observar as condições em que a presença de moluscos seria expectável. Nas **Figuras 30 a 33**, estão descritas as interpolações das variáveis temperatura, pH, condutividade elétrica e oxigénio dissolvido na água, de acordo com o método descrito aplicando o inverso da distância.

Os mapas permitem observar com base no gradiente de cores (valores mais elevados a vermelho e os valores mais baixos a azul), a dispersão e a variação das diferentes variáveis e a sua importância para a dispersão dos moluscos.

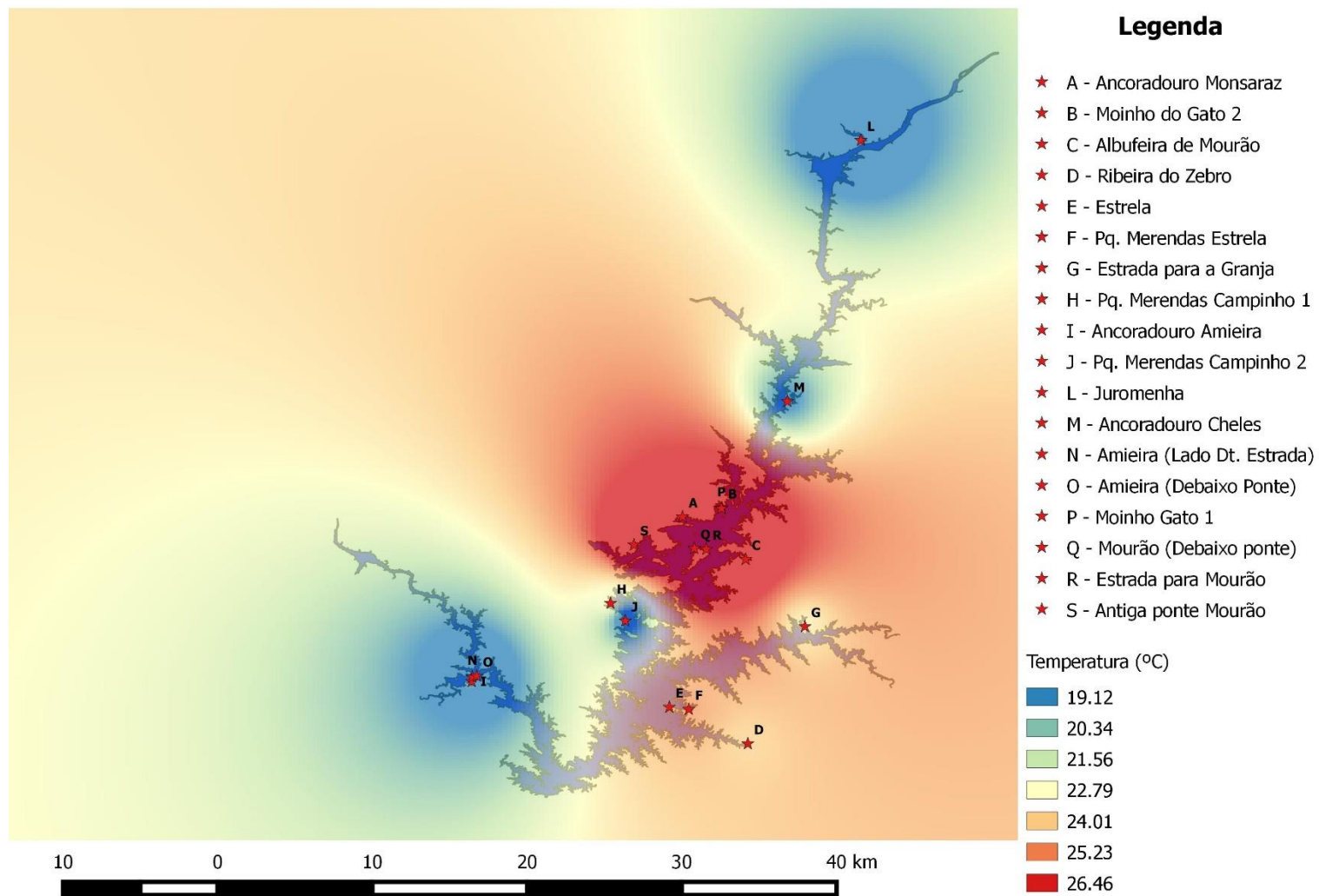
A **Figura 30** (interpolação da temperatura), mostra que os habitats com valores mais elevados estão concentrados num nicho bem localizado no centro da albufeira, e dele fazem parte: o ancoradouro de Monsaraz (A), os locais 1 e 2 do Moinho do Gato (P e B), a albufeira de Mourão (C), debaixo da ponte de Mourão (Q), a estrada para Mourão (R) e a antiga ponte de Mourão (S).

As periferias da albufeira apresentam os valores mais baixos de temperatura e delas fazem parte: Juromenha (L), o ancoradouro de Cheles (M) e a zona da Amieira (I, N e O).

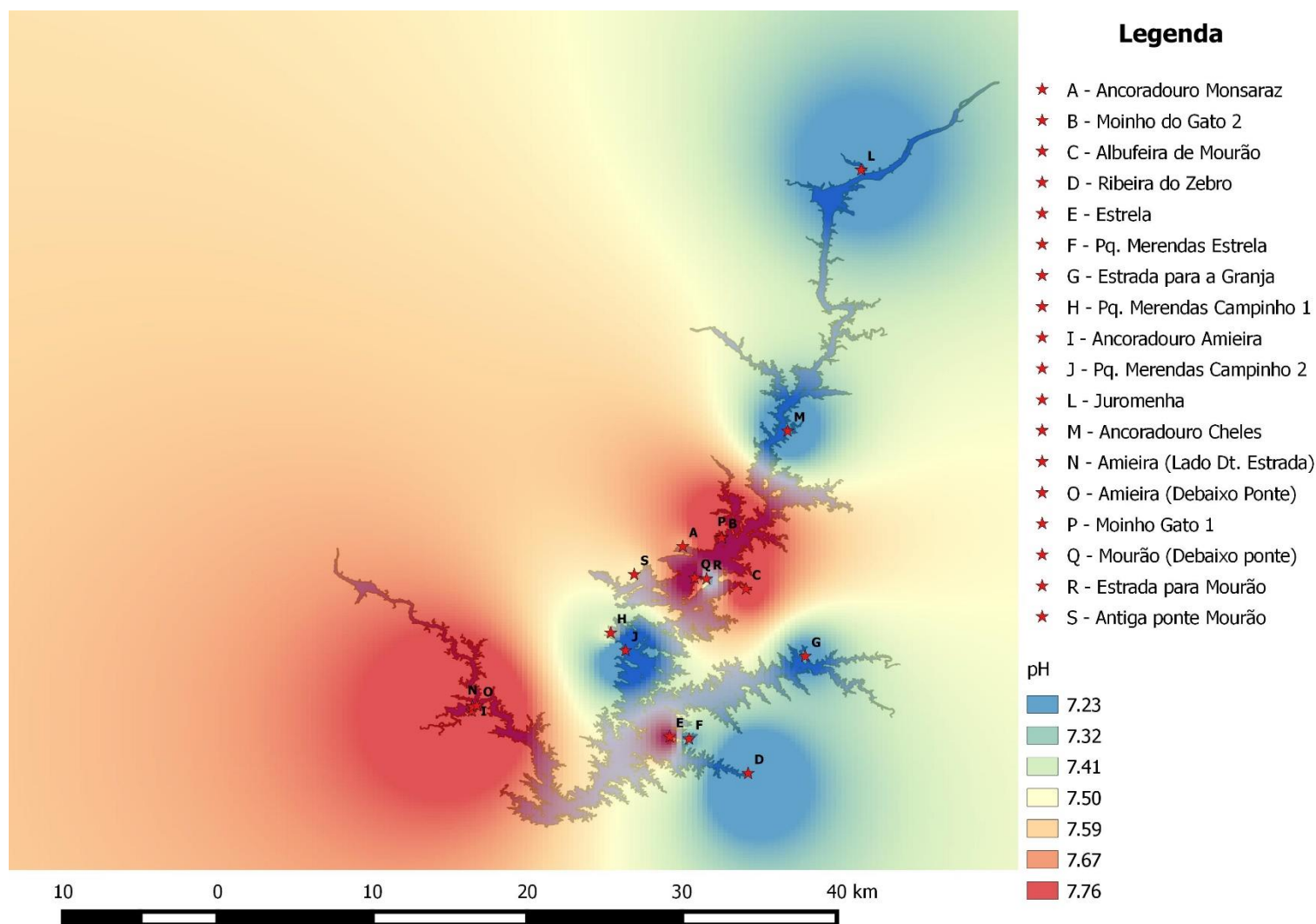
A **Figura 31** (interpolação do pH) mostra o mesmo nicho (A, P e B, C, Q e R) com valores mais elevados incluindo também, a zona da Amieira (I, N e O). A zona de Juromenha (L) e o ancoradouro de Cheles (M) voltam a apresentar os valores mais baixos assim como a zona da ribeira do Zebro (D) e da estrada para a Granja (G).

A **Figura 32** mostra a interpolação da condutividade elétrica, cujos resultados são inversos aos anteriores. Isto significa que as periferias (de Juromenha (L) e ribeira do Zebro (D) ) apresentam valores superiores relativamente à restante albufeira.

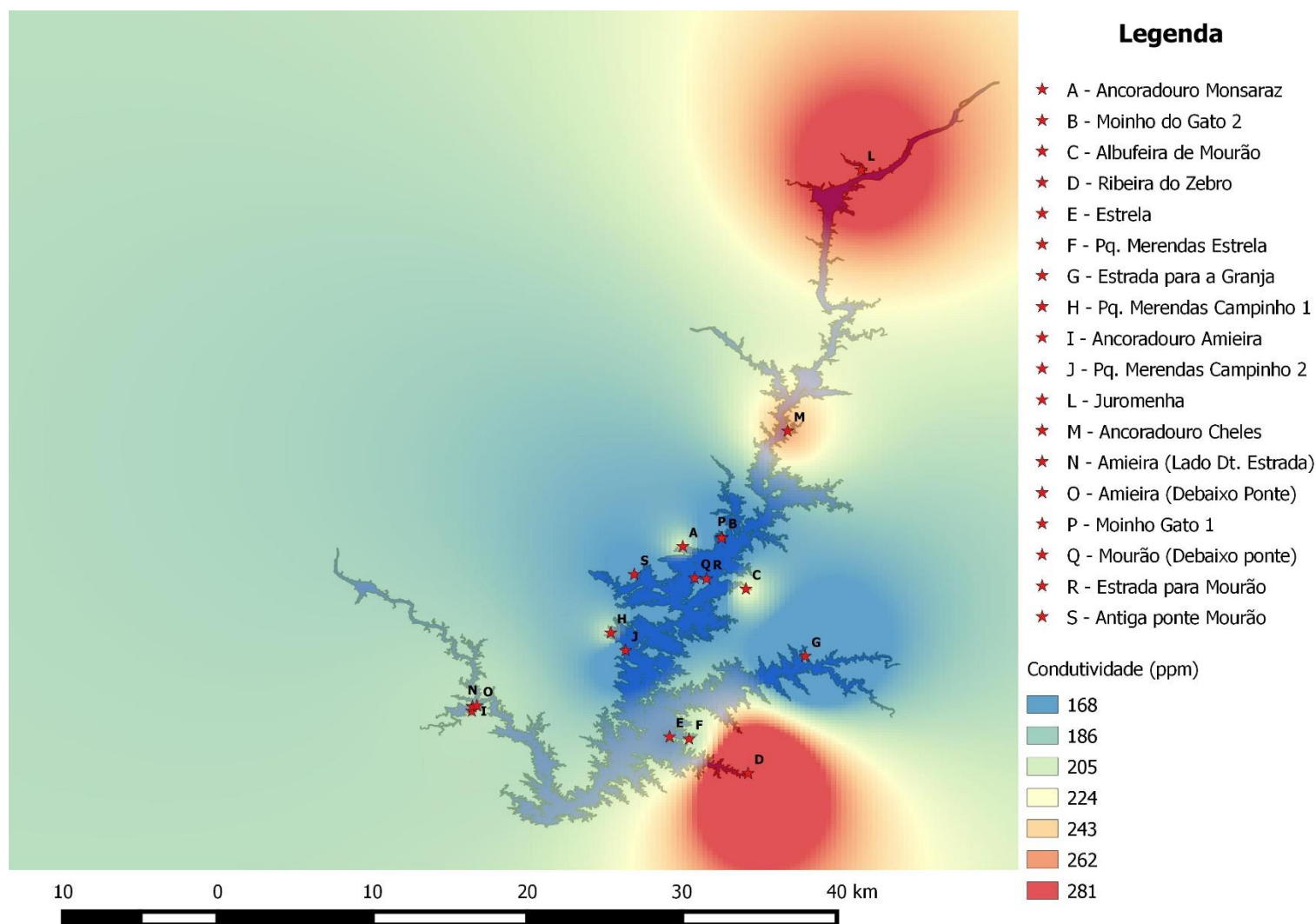
A **Figura 33** mostra a interpolação da oxigenação da água, cujos resultados são semelhantes aos obtidos para a temperatura.



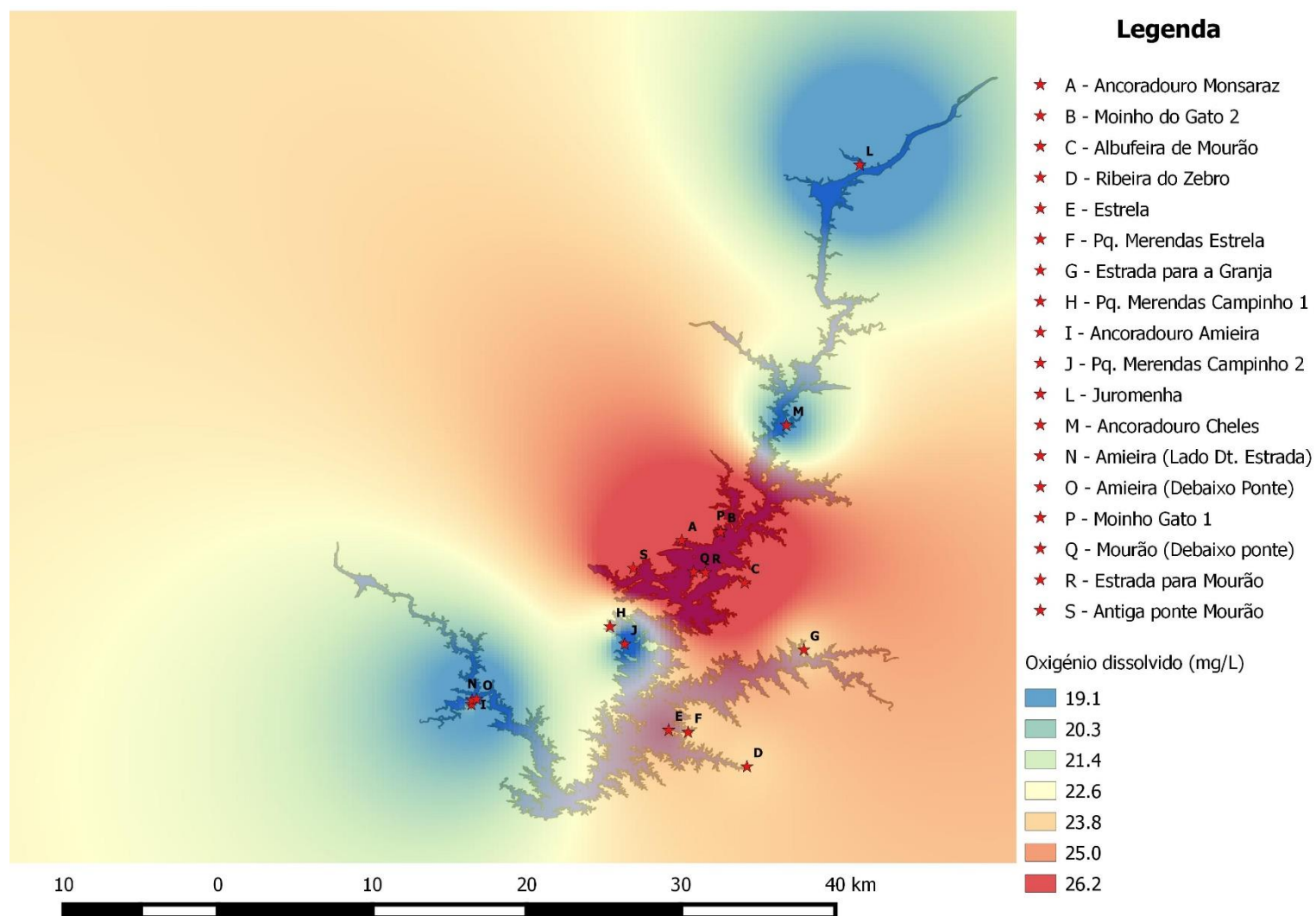
**Figura 30** – Interpolação da temperatura com recurso ao inverso da distância (Conchinha, 2015)



**Figura 31** – Interpolação do pH com recurso ao inverso da distância (Conchinha, 2015)



**Figura 32** – Interpolação da condutividade elétrica com recurso ao inverso da distância (Conchinha, 2015)

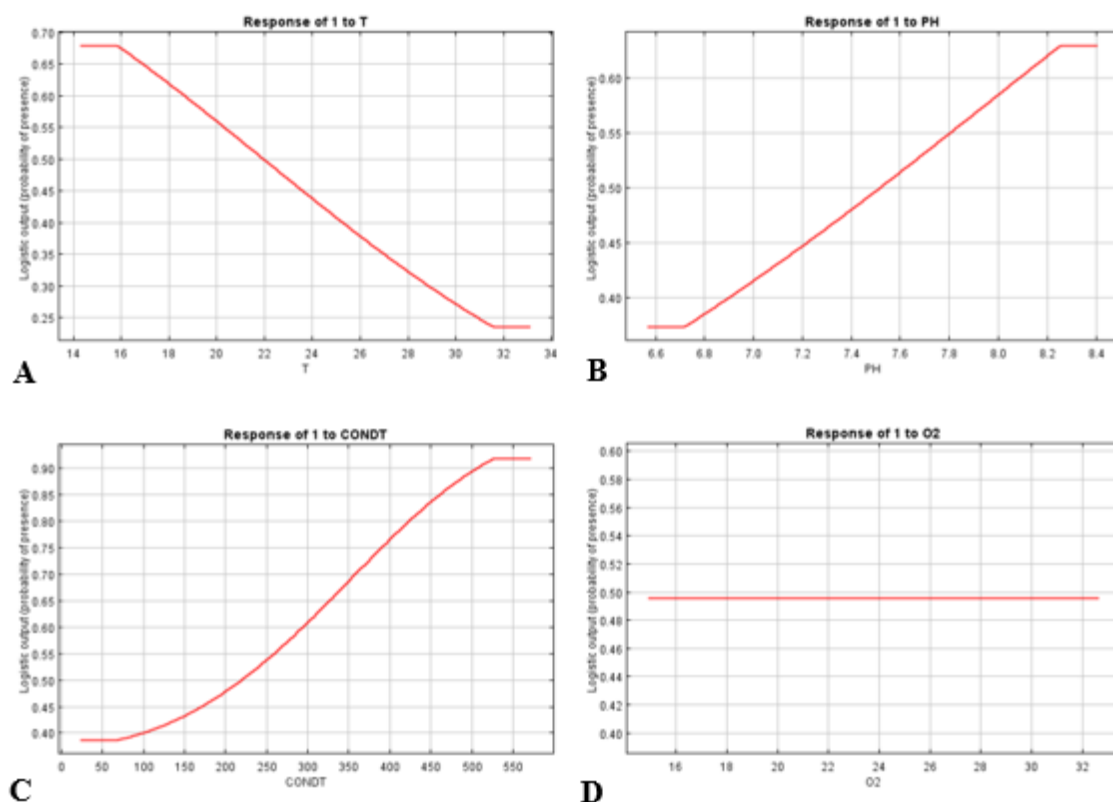


**Figura 33** – Interpolação do oxigénio dissolvido com recurso ao inverso da distância (Conchinha, 2015)



Para a prospeção da presença dos moluscos na albufeira com base nas variáveis ambientais (T, pH, Ce e O<sub>2</sub>) anteriormente descritas foi efetuado um modelo MaxEnt. Na **Figura 34**, as curvas obtidas para cada variável mostram a previsão logística para cada uma delas, mantendo as restantes o seu valor médio da amostra. É possível perceber que a temperatura apresenta uma influência inversamente proporcional, enquanto o pH e a condutividade elétrica apresentam uma influência diretamente proporcional. Por último o oxigénio dissolvido apresenta uma curva constante, ou seja, não há influência da variável.

A **Tabela 13** apresenta os valores percentuais de cada variável que contribuíram para a construção deste modelo. A temperatura apresenta assim valores de 58,8%, de 3,3% para o pH, de 37,3% para a condutividade elétrica e de 0% para o oxigénio dissolvido.



**Figura 34** – Curvas de influência das variáveis no modelo MaxEnt (Pereira 2015); **A** – Resposta à temperatura; **B** – Resposta ao pH; **C** – Resposta à condutividade elétrica; **D** – Resposta ao oxigénio dissolvido

**Tabela 13** – Contribuição das variáveis para a execução do modelo MaxEnt

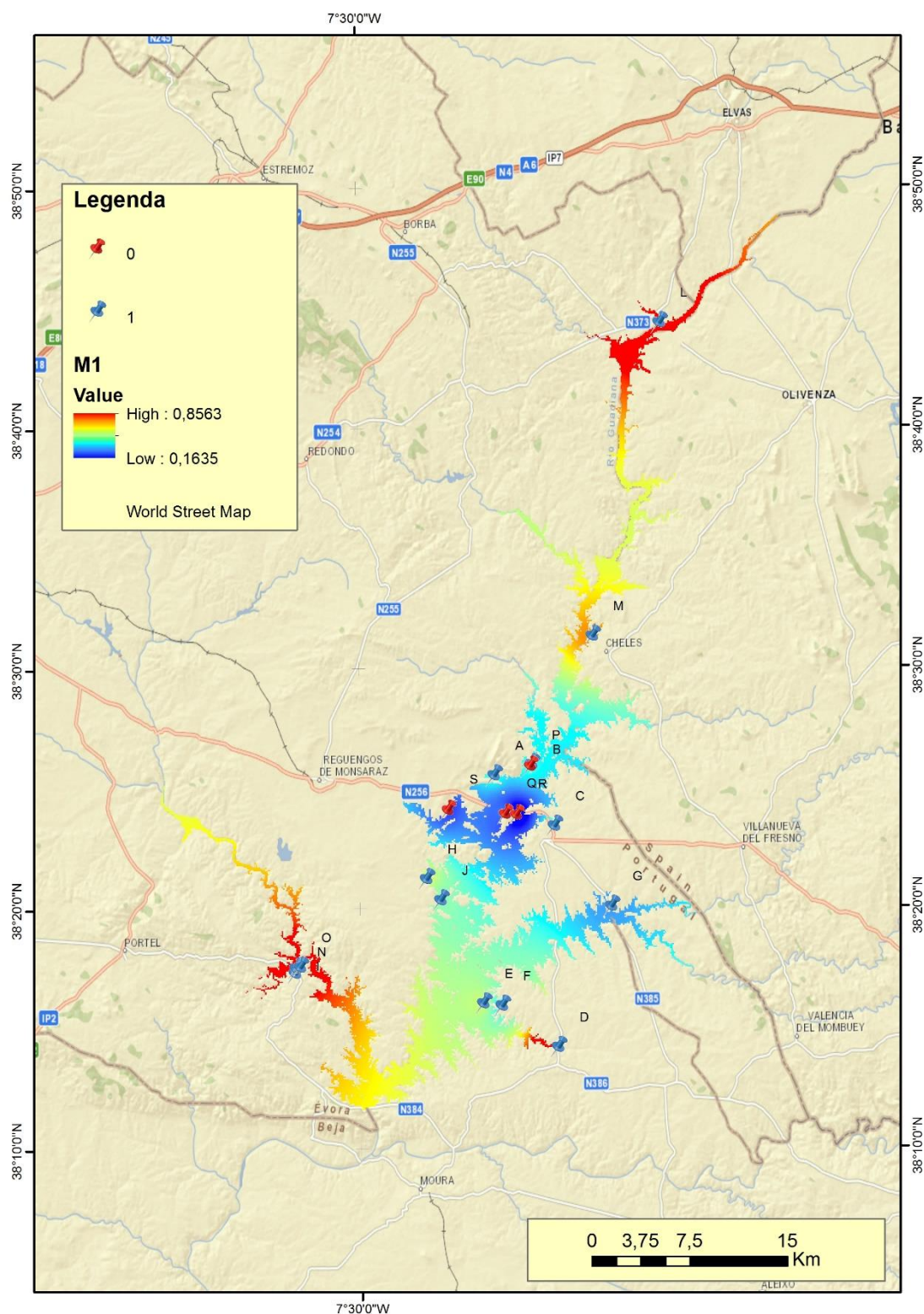
Variável	Contribuição (%)
T	58.8
Ce	37.8
pH	3.3
O <sub>2</sub>	0

Com a construção do modelo baseado nos dados obtidos pelas variáveis foi possível a sua sobreposição no mapa da albufeira do Alqueva, tendo sido construído o mapa da **Figura 35**. Este apresenta os habitats em que foram observados moluscos (pontos azuis), e onde não foram observados (pontos vermelhos).

Tal como afirmado anteriormente, o modelo valida a possibilidade da presença de moluscos não ter ocorrido aleatoriamente. Apesar de a amostragem ser reduzida foi observada a variabilidade e face aos pressupostos o modelo é representativo.

O modelo apresenta uma escala em gradiente de cor de vermelho a azul, onde o azul representa os valores mais baixos, ou seja, zonas onde a validade da amostra é mais baixa. A cor vermelha representa os valores mais elevados, e por isso, as zonas onde a validade da amostra é mais significativa.

Desta forma, com base nestas hipóteses, a zona da Amieira (I, N e O), da Juromenha (L) e da ribeira do Zebro (D) apresentam maior probabilidade da presença de moluscos, pois obtiveram valores mais elevados. Por outro lado, a zona centro da albufeira, formada por Monsaraz (A, B e P), Mourão (C, Q, R e S), Campinho (H e J), Estrela (E e F) e Granja (G), obtiveram os valores mais baixos. Assim, a probabilidade da presença de moluscos é menor e poderá ter sido apenas um evento aleatório.



**Figura 35** – Mapa da albufeira do Alqueva com a aplicação do modelo MaxEnt, com recurso às variáveis temperatura, pH, condutividade térmica e oxigenação da água (Pereira, 2015)

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A Albufeira do Alqueva, sendo o maior lago artificial da Europa (EDIA) alberga no seu todo vários habitats, onde a presença de moluscos de água doce pode ser encontrada. Estes moluscos representam uma elevada importância na distribuição de parasitoses por tremátodes, pois são necessários para que o parasita complete o seu ciclo de vida, atuando como hospedeiros intermediários (Golo *et al.*, 1998; Esch & Barger, 2001).

A presença de aves migratórias e de espécies residentes, tais como, pato-real (*Anas platyrhynchos*), pato trombeiro (*Anas clypeata*), garça-branca-pequena (*Egretta garzetta*), entre outras (EDIA), poderão contribuir para a manutenção do ciclo de vida de algumas espécies de tremátodes digenéticos, principalmente de dermatites cercarianas (swimmer's itch), já que as aves são os seus hospedeiros definitivos (Soldánová *et al.*, 2013). Estas parasitoses afetam a população em geral, causando muitas vezes reações cutâneas que causam incomodidade, podendo mesmo evoluir para condições mais severas (Pinto *et al.* 2012).

O levantamento malacológico que decorreu na albufeira do Alqueva teve como objetivo avaliar a presença de moluscos, a distribuição geográfica dos seus habitats e a sua relação com a ocorrência e/ou a probabilidade desta parasitose vir a ocorrer, bem como o impacto que determinados fatores bióticos e abióticos, principalmente a temperatura poderão ter no desenvolvimento e na dispersão dos moluscos e por conseguinte da parasitose.

Dos 18 habitats estudados, em 14 deles observou-se uma forte presença de moluscos, tendo sido colhidos um total de 582 exemplares. Apenas em quatro dos habitats não foi possível a colheita de moluscos durante o período em que decorreu o levantamento malacológico.

A espécie *Physa acuta* (Mollusca: Physidea) (syn. *Physella acuta*) foi a que apresentou o maior número de moluscos colhidos (com um total de 570 exemplares). Foram ainda encontrados seis exemplares da espécie *Lymnaea columella* e seis exemplares da espécie *Planorbarius metidjensis*.

A forte presença da espécie *P. acuta* remete para as observações de Nobre (1941) e Brown (1994), sobre a elevada capacidade de adaptação a diferentes meios e suas características de espécie invasora e colonizadora. Sendo por isso, natural que em habitats onde a presença destes moluscos seja abundante que a presença de outras espécies não seja notada de forma tão efusiva.

Considerando que o estudo decorreu durante um período temporal pequeno (outubro e dezembro) e realizada apenas uma única observação em cada habitat, a não presença de moluscos nos quatro habitats Moinho de Gato 1, Mourão (debaixo da Ponte), Mourão (estrada) e Mourão (antiga ponte), não deverá estar relacionada com as características bioecológicas destes. Os resultados que foram obtidos após a caracterização dos habitats parecem estar de acordo com as condições bioecológicas descritas por Azevedo *et al.* (1961), considerando os autores que a temperatura, vegetação e luz solar são alguns dos fatores que permitem o desenvolvimento dos moluscos.

A presença de cercárias do tipo *Furcocercus cercaria* ( $\approx$  Strigeidae), identificadas como potenciais agentes causais das dermatites cercarianas, observadas apenas no ancoradouro de Monsaraz, parece demonstrar que este habitat apresenta parâmetros bioecológicos que permitem o desenvolvimento do parasita na fase intramolusco e posterior eliminação de cercárias (Theron *et al.*, 1997; Kolářová *et al.*, 2013). Os valores encontrados foram de 26,5°C para a temperatura, 7,7 para o pH, 210  $\mu$ S/cm para a Ce e 26,1 mg/L para o O<sub>2</sub>.

A temperatura foi considerada por Azevedo *et al.*, (1961) como o fator climático mais importante no desenvolvimento dos moluscos. Nos resultados obtidos, a temperatura média observada foi de 23,7° C, o que significa que se encontra dentro dos parâmetros

que permitem o desenvolvimento dos moluscos (Wibaux-Chaloi *et al.*, 1982). Porém apresenta ao mesmo tempo, uma correlação negativa, mas significativa, o que indica que à medida que a temperatura aumenta, a probabilidade de se encontrar moluscos parece diminuir.

*Physa acuta* apresenta uma ampla distribuição geográfica, cujo sucesso na conquista de novos habitats tem por base a sua elevada taxa de reprodução e a tolerância a ambientes poluídos e com elevadas temperaturas (Seeland *et al.*, 2013).

Na realização deste estudo, os resultados obtidos parecem estar de acordo com trabalhos realizados por Albrecht *et al.* (2009), que demonstraram que a temperatura térmica ideal se situa entre os 20 e os 30°C. Contudo, esta espécie, apresenta uma boa tolerância a elevadas temperaturas da água.

Ainda no estudo realizado por Seeland *et al.* (2013), foi observada uma elevada mortalidade dos embriões quando sujeitos a uma temperatura de 25°C, embora nos adultos isso não se verifique. Já em 1956, Rey observou, para outras espécies de moluscos, que as condições ótimas de temperatura para a dispersão e desenvolvimento estão entre os 22 e os 28°C. Os resultados obtidos parecem estar em concordância com o descrito pelos vários autores, ou seja, à medida que a temperatura aumenta a probabilidade de se encontrar moluscos parece diminuir.

O aquecimento global que tem por base o aumento da temperatura é um dos fatores que parece condicionar a distribuição geográfica de muitos tremátodes e dos seus hospedeiros intermediários, estabelecendo condições favoráveis para a manutenção da infecção (Mas-Coma *et al.*, 2008). Assim, a adaptação desta espécie de moluscos a elevadas temperaturas da água poderá ser um benefício para a sua dinâmica populacional (Seeland *et al.*, 2013).

Quanto ao pH que variou entre 6,7 e 8,3, apresentando uma média de 7,7, este parece ter influenciado o número de moluscos colhidos. Azevedo e colaboradores (1961) observaram que em Moçambique, 95% dos moluscos hospedeiros intermediários de *Schistosoma* spp. encontravam-se em habitats com pH entre 5,2 e 8,2. Por outro lado, Brown (1994), na análise dos moluscos dulçaquícolas em África não considera que o pH seja um fator relevante para seu desenvolvimento.

Fatores como o oxigênio dissolvido e a condutividade elétrica (El-Khayat *et al.*, 2013; Spyra & Strzelec, 2014) também podem influenciar na dispersão desta espécie de moluscos, o que parece estar de acordo com os resultados obtidos.

Todos os habitats analisados apresentaram exposição solar “total”, facto extremamente importante no desenvolvimento de algas clorofíceas, principal fonte de alimentação (Paraense, 1983).

O tipo de vegetação na água é um fator a ter em conta, pois esta, para além de poder ser o seu alimento é também o local preferencial de posturas. Por outro lado, é também um meio de proteção da radiação solar direta e da velocidade da água (Brown, 1994). Por outro lado, não se verificou que o substrato fosse um fator influenciador na dispersão e desenvolvimento dos moluscos.

As características das conchas dos moluscos são usadas frequentemente para diferenciar populações ou até espécies dentro do mesmo género (Stothard *et al.*, 1997; Azevedo *et al.*, 1966). Estudos idênticos foram realizados com espécies do género *Physa* (Dillon & Jacquemin, 2015) e também com moluscos dos generos *Biomphalaria* (Azevedo *et al.*, 1966) e *Bulinus* (Sensen, 2002). Tendo sido possível a obtenção de dados para uma melhor compreensão sobre a relação dos moluscos com as condições ecológicas dos seus habitats, bem como fatores como o seu desenvolvimento sexual e idade que são importantes, principalmente, quando se trata de moluscos potenciais hospedeiros intermediários de tremátodes (Azevedo *et al.*, 1961; 1957).

Neste estudo foi possível observar que alguns moluscos *P. acuta* apresentavam conchas com “grandes dimensões”, contrastando com outras de mais “pequenas dimensões”. Fatores como a luz, em conjunto com a composição química da água, tipo de vegetação e principalmente a temperatura influenciam a densidade populacional (Ferté *et al.*, 2005; Faltýnkova, 2007), favorecendo o crescimento e a fecundidade dos moluscos, permitindo que os adultos possam produzir o maior número de posturas (Azevedo *et al.*, 1961). Dado que a maturidade sexual dos moluscos está diretamente relacionada com o seu tamanho e não com a sua idade, os moluscos jovens iniciarão mais cedo a deposição de posturas (Simões *et al.*, 1974).

Por outro lado o tamanho dos moluscos tem uma influencia direta na produção de cercárias, componente fundamental para que a transmissão de tremátodes tenha sucesso (Morley *et al.*, 2010).

Também estes autores demonstraram que moluscos de diferentes dimensões (10 - 17 mm) expostos em condições naturais de temperatura com intervalos entre os 10° e os 29°C, eliminavam menos cercárias em temperaturas mais baixas. À medida que a temperatura aumentava o número de cercárias eliminado também aumentava, atingindo o seu máximo entre os 17° e os 25°C. Isto pode indicar que a relação entre o tamanho dos moluscos e a temperatura é um fator importante para o desenvolvimento das cercárias no molusco, cuja relação poderá ser modificada devido às alterações climáticas.

Estes pressupostos parecem estar de acordo com os resultados obtidos para o ancoradouro de Monsaraz, cujas dimensões da concha e a temperatura da água permitiram o desenvolvimento e posterior eliminação de cercárias.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que os moluscos colhidos apresentaram em média, a altura total da concha de 9,3 mm e a largura total de 5,60 mm. Os habitats que apresentaram medidas morfométricas maiores foram o ancoradouro de Cheles e a ribeira de Zebro. O ancoradouro da Amieira foi o que apresentou a população de moluscos com dimensões mais pequena.

A variabilidade encontrada nas características morfométricas da concha de *P. acuta* nos diferentes habitats, permitiu evidenciar dois grupos distintos, em relação à proximidade de valores encontrados. Como apresentado por Dillon e Jacquemin (2015) as semelhanças estimadas em laboratório podem ser exportadas para a natureza, e desta forma é possível chegar a conclusões próximas da realidade sobre a dispersão e as características dos moluscos com base nos habitats identificados.

Durante várias décadas, a caracterização das diferentes espécies de moluscos baseava-se apenas em dados fenotípicos (características morfológicas das conchas e partes moles), os quais se mostraram insuficientes para distinguir espécies e subespécies (Malek & Cheng, 1974; Brown 1994, Stothard *et al.*, 1997). A caracterização genética dos moluscos é mais uma das alternativas para quantificar a sua diversidade. O presente



estudo permitiu apresentar as primeiras sequências, ainda que parciais dos genes 16S e CO1 de *Physa acuta* provenientes da região do Alqueva.

A diversidade haplotípica é um índice que reflete a probabilidade de dois haplotípos escolhidos ao acaso numa população serem diferentes, enquanto a diversidade nucleotídica reflete a probabilidade de dois nucleótidos homólogos escolhidos ao acaso serem diferentes (Nei & Li, 1979). Nenhum dos genes apresentou uma elevada diversidade nucleotídica, com 0,0164 e 0,062 para o gene 16S e CO1, respetivamente.

Em 2003, Dejong e colaboradores compararam duas espécies de moluscos do género *Biomphalaria*, demonstrando que as duas espécies apresentavam uma elevada diversidade nucleotídica a qual estava relacionada com a presença de um elevado número de haplotípos, característica presente em moluscos de água doce com capacidade de dispersão reduzida, a qual parece estar relacionada com o isolamento geográfico.

Os resultados obtidos mostram uma baixa diversidade nucleotídica, a qual poderá ser justificada pela elevada dispersão que esta espécie de moluscos apresenta. Para uma melhor compreensão da variabilidade genética das populações de *P. acuta* do Alqueva será necessário alargar o estudo a um número maior de amostras.

Os genes 16S e CO1 têm sido estudados por vários autores, sendo os mais promissores em estudos de relações filogenéticas e evolutivas entre espécies dentro da família Physidae (Wethington & Lydeard, 2007; Pip & Franck, 2008), na identidade taxonómica de espécies distintas (Gates *et al.*, 2013) ou ainda, em estudos populacionais e de reprodução (Dillon *et al.*, 2011).

A comparação das amostras do Alqueva ainda que em pouco número, com as que se encontravam na base de dados evidenciou uma elevada homologia para os dois genes em estudo (99%), demonstrando mais uma vez a importância que estes dois marcadores desempenham na caracterização molecular dos moluscos.

Os Sistemas de Informação Geográfica apresentam-se atualmente como um verdadeiro aliado no estudo das parasitoses e também nos estudos de variabilidade das populações. Como descrito por Gamboa (2014) é possível num mesmo mapa fazer uma correlação espacial e prever assim as áreas com maior vulnerabilidade para a amostra em estudo.

Para a realização do estudo em causa foi aplicado um modelo MaxEnt que visava aferir se a ocorrência de moluscos com base nas variáveis apresentadas não terá ocorrido de forma aleatória (Jobe e Zank, 2008).

Na aplicação do modelo MaxEnt foi testada a hipótese da ocorrência dos moluscos não ser aleatória. As variáveis ambientais foram estudadas tendo em conta a sua contribuição para o modelo, desta forma foi possível confirmar qual a relevância de cada uma para a presença dos moluscos nos diferentes habitats.

A expectativa seria com base nos resultados obtidos por outros autores como Schotle *et al.* (2012); (2014) a criação de um mapa onde pudesse ser obtida a confirmação dos locais onde seria de esperar que se encontrassem moluscos.

Também com base em estudos de interpolação das variáveis ambientais foi possível observar de forma clara quais os habitats que apresentam maior número de moluscos quando analisadas separadamente estas mesmas variáveis.

Os resultados foram de certa forma os esperados quando contrapostos com os restantes estudos estatísticos já efetuados. A temperatura e o oxigénio dissolvido na água apresentam resultados muito semelhantes e sugerem que as zonas ideais para se poderem encontrar moluscos serão as do centro da albufeira. O mesmo acontece com a interpolação da variável pH que sustenta a hipótese de um nicho ideal no centro da albufeira. Paralelamente a condutividade elétrica apresenta valores mais elevados nas zonas periféricas, onde inclusive foram colhidos os maiores números de moluscos.

A temperatura, como já esperado, parece ser o fator determinante, juntamente com a condutividade elétrica (Morley *et al.*, 2010; El-Khayat *et al.*, 2013). E ainda que a zona do centro da albufeira parecesse ser o nicho ideal para a manutenção dos moluscos, são as zonas periféricas aquelas que, segundo o modelo, oferecem maior estabilidade à hipótese de que as presenças não tenham sido aleatórias.

Em suma, pode esperar-se que na albufeira do Alqueva a presença de moluscos seja encontrada fortemente nas áreas dos extremos do regadio, ainda que seja possível encontrar moluscos um pouco por toda a sua extensão.

Para já aponta-se o ancoradouro de Monsaraz como um potencial foco de infeção que associado à presença das aves migratórias e residentes no local, poderá também permitir a sua dispersão. Sendo este um local bastante utilizado pela população para

atividades recreativas e de lazer, requer uma maior vigilância dos hospedeiros intermediários para um possível controlo de potenciais ocorrências de dermatites cercarianas e outras parasitoses zoonóticas quer na população humana, quer na população animal.

Face aos resultados apresentados neste estudo, podemos concluir que:

- a) Existe uma forte presença da espécie *Physa acuta* na albufeira do Alqueva, a qual tem uma ampla distribuição e adaptabilidade a vários habitats;
- b) A temperatura parecer ser um fator determinante na distribuição e variabilidade dos moluscos, e cujo aumento poderá favorecer a sua dispersão;
- c) Outros fatores como o pH, o oxigénio dissolvido, a condutividade elétrica, a vegetação e a exposição solar também estão relacionados com a dispersão dos moluscos;
- d) *P. acuta* apresenta uma alta variabilidade nas características morfométricas da concha;
- e) A eliminação de cercárias no ancoradouro de Monsaraz está relacionada com a temperatura e as dimensões da concha;
- f) A presença de aves residentes e migratórias no ancoradouro de Monsaraz, único habitat em que houve libertação de cercárias, poderá conduzir a uma dispersão do parasita;
- g) Recorrendo aos SIG foi possível determinar as zonas periféricas da albufeira como aquelas onde há maior probabilidade da ocorrência de moluscos;
- h) Os resultados apresentados para os genes 16S e CO1 parecem confirmar que estes marcadores são uma boa ferramenta na caracterização molecular das populações destes moluscos.

Estudos futuros poderão vir a ser desenvolvidos para obter dados mais alargados sobre a albufeira do Alqueva, a diversidade dos moluscos e a identificação de novos habitats, assim como o seu papel como potenciais hospedeiros intermediários de tremátodos zoonóticos.

Os resultados obtidos reforçam a necessidade de uma prospeção mais aprofundada neste ecossistema de modo a identificar o risco de ocorrência destas parasitoses zoonóticas emergentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht, C., Kroll, O., Terrazas, E.M. & Wilke, T. 2009. Invasion of ancient Lake Titicaca by the globally invasive *Physa acuta* (Gastropoda: Pulmonata: Hygrophila). *Biological Invasions*, **11**: 1821-1826.
- Albrecht, C., Kuhn, K. & Streit, B. 2007. A molecular phylogeny of Planorbidea (Gastropoda, Pulmonata): insights from enhanced taxon sampling. *Zoologica Scripta*, **36** (1): 27-39.
- Alyakrinskaya, I.O. 2002. Physiological and biochemical adaptations to respiration of haemoglobin-containing hydrobionts. *Biology, Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, **29**: 268–283.
- Azevedo, J.F., Medeiros, L.C. & Costa Faro M.M. 1957. Moluscos de água doce do Ultramar Português II – Moluscos do sul do Save (Moçambique). *Junta de Investigação do Ultramar; Estudos, Ensaios e Documentos*. **88**: 398págs.
- Azevedo, J.F., Medeiros, L.C., Costa Faro M.M., Xavier, M.L., Franco, A. & Tito de Moraes. 1961. Os Moluscos de água doce do Ultramar Português III – Moluscos de Moçambique. *Junta de Investigação do Ultramar; Estudos, Ensaios e Documentos*. **88**: 398págs.
- Azevedo, J.F., Xavier, M.L. & Pequito, M.M. 1966. The importance of biometrical observations concerning schistosomiasis vector snails. *Sep. Garcia de Orta*, **14** (3): 325-342.
- Bergquist, N.R. 2002. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitology*, **18**: 309 – 314.
- Brooker S., Clements A.C.A., Bundy D.A.P. 2006. Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. *Adv. Parasitol*, **62**:223–265.

Brown, D.S. 1994. Freshwater snails os Africa and their Medical importance. 2nd Edition. *Taylor & Francis, London*, 247-249.

Burkhart, C.G. & Burkhart, C.N. 2003. Swimmer's itch: Na assessment proposing possible treatment with ivermectin. *International Journal of Dermatology*, **42**: 917-918.

Centers for Disease Control and Prevention. Parasites – Cercarial Dermatitis (also know as Swimmer's Itch): Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/swimmersitch/index.html> (acedido em 23 de maio de 2015).

Cerroni, L., Wolf, P. & Kerl, H. 1997. Cercarial dermatitis. *G Ital Dermatol Venereol*, **132**: 397-40.

Coelho, A.L.N. 2009. Sistemas de Informações Geográficas (SIG) como suporte na elaboração de planos diretores municipais. *Caminhos de Geografia*, **10** (30): 93-110.

Combes, C. 1980. Atlas Mondial des Cercaires. *Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle, Série A, Zoologie*, **115**: 5-235.

Cooper, G.M. & Hausman, R.E. 2007. A Célula Uma Abordagem Molecular. *Artmed*. 3ª edição, 112-117.

Dejong, R.J., Morgan, J.A.T., Wilson, W.D., Jaser, M.H., Appleton, C.C., Coulibaly, G., D'Andrea, P.S., Doenhoff, M.J., Haas, W., Idris, M.A., Magalhães, L.A., Moné, H., Mouahind, G., Mubila, L., Pointier, J-P., Webster, J.P., Zanotti-Magalhães, M., Paraense, W.L., Mkoji, M. & Loker, E.S. 2003. Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfefferi*, importante intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World Tropics. *Molecular Ecology*, **12** (11): 3041-3056.

Dillon, R.T.Jr. & Jacquemin S.J. 2015. The heritability of shell morphometrics in the freshwater pulmonate gastropod *Physa*. *Plos One*, **10** (4): 1-13.

Dillon, R.T., Wethington, A.R. & Lydeard, C. 2011. The evolution of reproductive isolation in a simultaneous hermaphrodite, the freshwater snail *Physa*. *BMC Evolutionary Biology*, **11**: 144

Dillon, R.T.Jr. 2006. The freshwater gastropods of North America: Disponível em <http://www.fwgna.org> (acedido em 07 de junho de 2015).

EDIA. Alqueva, uma nova terra de oportunidades: Disponível em <http://www.alqueva.com.pt/> (acedido em 11 de maio de 2015).

EDIA. Empresa de Desenvolvimento e Infraestruturas do Alqueva: Disponível em <http://www.edia.pt/> (acedido em 11 de maio de 2015).

El-Khayat, H.M.M., Eissa, F.I. Mostafa, M.A. & Fiefel, H.E. 2013. Distribution of *Schistosoma* intermediate hosts in relation to aquatic plants and physico-chemical characteristics in different watercourses among Kafr El-Sheikh centers, Egypt. *Nature and Science*, **11** (12): 146-155.

Esch G.W., Curtis L.A. & Barger M.A. 2001. A perspective on the ecology of trematode communities in snails. *Parasitology*, **123**: 57-75.

Faltýnkova, A. 2007. Larval trematodes (Digenea) in molluscs from small water bodies near Šeské Budšjovice, Czech Republic. *Acta Parasitologica*, **50** (1), 49-55.

Ferté, H., Depaquit, J., Carré, S., Villena, I. & Léger, N. 2005. Presence of *Trichobilharzia szidati* in *Lymnaea stagnalis* and *T. franki* in *Radix auricularia* in northeastern France: molecular evidence. *Parasitol Res*, **95**: 150-154.

Fenwick, A., Webster, J.P. 2006. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Current Opinion on Infectious Disease*, **19** (6): 577 – 582.

- Folmer, O., Black, M., Hoen, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, **3** (5): 294–299.
- Frandsen, F. & Christensen, N.Ø. 1984. An introductory guide to the identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species of medical and veterinary importance. *Acta Tropica*, **41**: 181-202.
- Fraser, S.J., Allan, S.J.R., Roworth, M., Smith, H.V. & Holme, S.A. 2009. Cercarial dermatitis in the UK. *Clinical and Experimental Dermatology*, **34** (3): 344–346.
- Gamboa, M.I., Giambelluca, L.A. & Navone, G.T. 2014. Distribución espacial de las parasitosis intestinales en la Ciudad de la Plata, Argentina. *Medicina*, **74** (5): 363-370.
- Gates, K.K., Kerans, B.L., Keebaugh, J.L., Kalinowski, S. & Vu, N. 2013. Taxonomic identity of the endangered Snake River physa, *Physa natricina* (Pulmonata: Physidae) combining traditional and molecular techniques. *Conserv Genet*, **14**: 159-169.
- Gentile, L. Picot, H., Bourdeau, P., Bardet, R., Kerjan, A., Piriou, M., Guennic, A., Bayssade-Dufour, C., Chabasse, D. & Mott K.E. 1996. La dermatite cercarienne en Europe: un probleme de sante publique nouveau? *Bulletin de l' Organisation Mondiale de la Santé*, **74** (2): 159-163.
- Golo, D., Accordini, A., Consolaro, S., Mosconi, M.C. & Ferrari, A. 1998. Swimmer's itch in Lake Garda. *Ig Mod*, **110**: 443–457.
- Grande, C., Templado, J., Cervera, J.L. & Zardoya, R. 2004. Molecular Phylogeny of Euthyneura (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Biology and Evolution*, **21** (2): 303-313.
- Grupo de projeto Alqueva Agrícola. 2005. Caracterização da Zona do Alqueva. *Plano de Intervenção para a zona do Alqueva*, 12-16.
- Hertel, J., Hamburger, J., Haberl, B. & Haas, W. 2002. Detection of bird schistosomes in lakes by PCR and filter-hybridization. *Experimental Parasitology*, **101**: 57-63.



Horák, P. & Kolářová, L. 2011. Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. *Freshwater Biology*. **56**(4), pp.779–790.

Jobe, R.T. & Zank, B. 2008. Modelling species distributions for the Great Smoky Mountains National Park using Maxent, 1-27.

Jumberg, P. Vasconcellos, M.C. & Mendes, N.M. 1989. Plantas Empregadas como moluscicidas: uma visão crítica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **84** (I): 76-83.

Kolářová, L., Horák, P., Skírnisson, K., Marečková, H. & Doenhoff, M. 2013. Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, **45** (1): 63–74.

Kumar, S., Tamura, K. & Nei, N. 2004. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**: 150-163.

Malek, E.A. 1980. Snail transmitted parasitic diseases. *CRC Press*, **I**: 129-135.

Malek, E.A. & Cheng, T.C. 1974. Medical and Economic Malacology. *Academic Press INC*, 49-58.

Mas-Coma, S., Valero, M.A. & Bargues, M.D., 2009. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, **163** (4): 264–280.

Mas-Coma, S., Valero, M.A. & Bargues, M.D., 2008. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, **27** (2): 443–457.

- Ministério da Saúde. 2008. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes técnicas: Programa de vigilância e controle de esquistossomose (PCE). *Secretaria da Vigilância em Saúde. Gráfica Brasil*. 177págs.
- Miranda, P.M.A. *et al.* 1995. Estudo de impacte ambiental do Alqueva – Relatório Final. *Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia – FCUL*, 1-186.
- Nei, M. & Li, W.S. 1979. Mathematical model for studding genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. of Nat. Acad. of Sciences of USA*, **76**: 5269-5273.
- Nobre, A. 1941. Fauna malacológica de Portugal – moluscos terrestres e fluviais. *Mem. Estudos do Museu Zool. Univ. Coimbra*, **124**: 278págs.
- O Melhor Alentejo do Mundo. Disponível em: <http://omelhoralentejodomundo.blogspot.pt/2014/03/observacao-de-aves-no-alqueva.html> (acedido em 11 de maio de 2015).
- Okamura B. & Feist S. 2011. Emerging diseases in freshwater systems. *Freshwater Biology*, **56**: 627-637.
- Palumbi S.R., Martin A., Romano S., McMillan W.O., Stice L. & Grabowski G. 2002. The simple fool's guide to PCR version 2. *University of Hawaii*, **96822** (808): 1–45.
- Paraense W.L. & Pointier J-P. 2003. *Physa acuta* Draparnaud, 1805 (Gastropoda: Physidae): A Study of Topotypic Specimens. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98** (4): 513–517.
- Paraense, W.L. 1983. *Lymnaea columella* in northern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **78**: 477-482.
- Pereira, M. Lourenço, R. & Mira, M. 2011. The role of habitat connectivity on road mortality of tawny owls. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología de la Información Geográfica*, **11**: 70-90.

- Phillips, S.J., Anderson, R.P. & Schapired, R.E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, **190**: 231-259.
- Pilz, J., Eisele, S. & Disko, R. 1995. Cercarial dermatitis (swimmer's itch). Case report of cercarial dermatitis caused by *Trichobilharzia*. *Hautarzt*, **46**: 335-338.
- Pinto H.A., Mati V.L.T. & Melo A.L. 2012. Dermatite cercariana por esquistossomatídeos de aves: É possível a ocorrência de casos no Brasil? *Revista de Patologia Tropical*, **41** (1): 1-14.
- Pip, E. & Franck, J.P.C. 2008. Molecular phylogenetics of central Canadian Physidae (Pulmonata:Basommatophora). *Can. J. Zool.*, 86: 10-16.
- Pontier, J-P., Coustau, C., Rondelaud, D. & Theron, A. 2007. *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Paristol Res*, **101**: 1389-1392.
- Remigio, E.A. 2002. Molecular phylogenetic relationships in the aquatic snail genus *Lymnaea*, the intermediate host of the causative agente os fascioliasis: insights from broader taxon sampling. *Parasitol Res*, **88**: 687-696.
- Rey, L. 2008. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro, *Editora Guanabara Koogan*, **16**: 165-194.
- Rey, L. 1956. Contribuição para o conhecimento da Morfologia, Biologia e Ecologia dos Planorbídeos Brasileiros transmissores de Esquistossomose. *Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, Brasil*.
- Rollinson, D., Stothard, J.R., Jones, C.S., Lockyer, A.E., Pereira de Souza, C. & Noble, L.R., 1998. Molecular charcterisation of intermediate snails hosts the search for resitance genes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **93** (Suppl.1): 111-116.

Roteiro do Alqueva. Roteiro do Alqueva: Disponível em <http://www.roteirodoalqueva.com/> (acedido em 11 de maio de 2015)

Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19** (1): 2496-2497.

Saiki, R.K., Scharf, S., Fallona F., Mullis K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230** (4732): 1350 – 1354.

Schotle, R.G.C., Gosoniu, L., Malone, J.B., Chammartin, F., Utzinger, J. & Vounatsou, P. 2014. Predictive risk mapping of Schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Tropica*, **132**: 57-63.

Scholte, R.G.C., Carvalho, O.S., Malone, J.B., Utzinger, J. & Vounatsou, P. 2012. Spacial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. *Geospatial Health*, **6** (3): 95-101.

Seeland, A., Albrand, J., Oehlmann, J. & Müller, R. 2013. Life stage-specific effects of the fungicide pyrimethanil and temperature on the snail *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) disclose the pitfalls for the aquatic risk assessment under global climate change. *Environmental Pollution*, **174**: 1-9.

Selbach, C., Soldánová, M. & Sures, B. 2015. Estimating the risk of swimmer's itch in surface waters – A case study from Lake Baldey, River Ruhr. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **216** (2): 1-7.

Sensen, R. 2002. A study on the Conchological Features of two populations of *Bulinus truncatus* (Gastropoda: Pulmonata) in Turkey. *Turk J Zool*, **28** (2004): 145-148.

- Simões, M., Grácio, M.A.A. & Azevedo, J.F. 1974. Effects of the populacional density on the growth and fecundity of specimens of th *Bulinus* sp. *Sep. Anais Inst. Hig. Med. Trop.*, **II** (1-4): 535-539.
- Singh, B. 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International journal for parasitology*, **27**(10): 1135–1145.
- Soldánová, M., Selbach, C., Kalbe M., Kostadinova A. & Sures, B. 2013. Swimmer's itch: Etiology, impact, and risk factors in Europe. *Trends in Parasitology*, **29**(2): 65–74.
- Souza, C.P. & Lima, L.C. 1990. Moluscos de interesse Parasitológico do Brasil, série Esquistossomose 1, 2<sup>a</sup> ed. *Fundação Oswaldo Cruz, centro de pesquisa René Rachou, Belo horizonte*, 79.
- Spyra, A. & Strzelec, M. 2014. Identifying factors linked to the occurrence of alien gastropods in isolated woodland water bodies. *Naturwissenschaften*, **101**: 229-239.
- Stothard, J.R., Hughes, S. & Rollinson, D. 1996. Variation within the Internal Transcribed Spacer (ITS) of Ribosomal DNA genes of intermediate snail hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Acta Tropica*, **61**: 19-29.
- Sub Göttingen. Animal Base search page: Disponível em <http://www.animalbase.uni-goettingen.de/> (acedido em 7 de junho de 2015)
- Théron, A., Pages, J.R. & Rognon, A. 1997. *Schistosoma mansoni*: Distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host suceptibility and sporocyst regulatory processes. *Experimental Parasitology*, **85** (1): 1-9.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, position specific Gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **11** (22): 4673-4680.

Verbrugge, L.M., Rainey, J.J, Reimink, R.L & Blankespoor, H.D. 2004. Swimmer's Itch: incidence and risk Factors. *American Journal of Public Health*, **94** (5): 738-741.

Wethington, A.R., Wise, J. & Dillon R.T.J. 2009. Genetic and morphological characterization of the Physidae of South Carolina (Gastropoda: Pulmonata: Basommatophora), with description of a new species. *Nautilus*, **123** (4): 282.

Wethington, A.R. & Lydeard, C. 2007. A molecular phylogeny of Physidae (Gastropoda: Basommatophora) based on mitochondrial DNA sequences. *J Molluscan Stud*, **73**: 241-257.

Wethington, A.R., 1980. Family Physidae (Shell pictures taken from Burch and Tottenham 1980) Family Physidae Family Physidae. *North*.

Wibaux-Charloi, M., Yelnik, A., Ibraihma, H., Same-Ekobo, A. & Ripert, C. 1982. Étude épidémiologique de la bilharziose a *S. haematobium* dans le périmètre rizicole de Yagoua (Nord-Cameroun). *Bull. Soc. Path. Ex.*, **75** (1): 72-93.

# ANEXOS

## Anexo I – Ficha de Campo

### Moluscos de Água Doce – Ficha de Campo

Observação nº _____ Data ____/____/____ Hora ____ : ____
--

<b>Localização do criadouro</b> _____ Localidade mais próxima _____ Concelho _____ Distrito _____ Altitude _____ Latitude _____ Longitude _____
---

<b>Formação e Manutenção do criadouro</b> _____ Rio <input type="checkbox"/> Ribeiro <input type="checkbox"/> Pequeno caudal de água <input type="checkbox"/> Lago <input type="checkbox"/> Lagoa <input type="checkbox"/> Canal de Irrigação <input type="checkbox"/> Charco <input type="checkbox"/> Poça <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/>
---

<b>Carácter do criadouro</b> _____ Permanente <input type="checkbox"/> Temporário <input type="checkbox"/> Área de superfície da colecção de água _____
--

<b>Ecologia e Biologia do criadouro</b> _____ Vegetação na colecção de água: Emergente <input type="checkbox"/> Flutuante <input type="checkbox"/> Imersa <input type="checkbox"/> Nula <input type="checkbox"/> Vegetação na margem, projectada sobre o criadouro: muita <input type="checkbox"/> pouca <input type="checkbox"/> nenhuma <input type="checkbox"/> Quantidade de vegetação aquática: Leve <input type="checkbox"/> Densa <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> Tipo de vegetação na água: _____ Tipo de vegetação na margem do criadouro: _____ Exposição solar: Total <input type="checkbox"/> Fraca <input type="checkbox"/> Escassa <input type="checkbox"/> Mínima <input type="checkbox"/> Nula <input type="checkbox"/>
---

<b>Substrato</b> _____ Rochas <input type="checkbox"/> Areia <input type="checkbox"/> Argila <input type="checkbox"/> Humus <input type="checkbox"/> Matéria em composição <input type="checkbox"/>
--

**Contacto com o Homem**

Distância à habitação \_\_\_\_\_ Uso da colecção de água pela pop. local: Sim ☐ Não ☐

**Outras características do criadouro**

Aves aquáticas: Sim ☐ Não ☐

Mamíferos: Sim ☐ Não ☐

**Características físico-químicas da água do criadouro**

Cor: Incolor ☐ Escura ☐

Cheiro: Inodora ☐ Fétida ☐

Limpidez: Límpida ☐ Turva ☐

Dureza Total: \_\_\_\_\_ Dureza (CaCO<sub>3</sub>): \_\_\_\_\_

Profundidade: <50 cm ☐ >50cm ☐

Temperatura da água (à superfície): \_\_\_\_\_ pH \_\_\_\_\_ Condutividade \_\_\_\_\_

Oxigenação: \_\_\_\_\_ mg/L

**Laboratório**

Espécies colectadas	Jovens	Adultos	Total